



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Efecto de distintos mediadores redox en la
eliminación simultánea de sulfuro y *p*-cresol por vía
desnitrificante**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A

M.I. EDNA ROSALBA MEZA ESCALANTE

COMITE TUTORIAL

Director: Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

Co-Director: Dr. Jorge Gómez Hernández

Asesora: Dra. Anne-Claire Texier Valentin

México, D. F.

Abril de 2008

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Microbiana del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. (IPICYT). Gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como al apoyo financiero recibido a través del proyecto (SEP-CONACYT-C02-43144).

El doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa esta inscrito en el Padrón Nacional de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de registro 0472-0.

Iztapalapa, D.F. a 25 de abril de 2008.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis

**EFFECTO DE DISTINTOS MEDIADORES REDOX EN LA ELIMINACIÓN
SIMULTÁNEA DE SULFURO Y *p*-CRESOL POR VÍA DESNITRIFICANTE**

Que presentó

EDNA ROSALBA MEZA ESCALANTE

Comité Tutorial

Director: Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo



Co-Director: Dr. Jorge Gómez Hernández



Asesora: Dra. Anne-Claire Texier Valentin

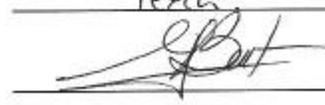
Texier

Jurado

Presidenta: Dra. Anne-Claire Texier Valentin
UAM-Iztapalapa, México

Texier

Secretario: Dr. Germán Buitrón Méndez
UNAM, México



Vocal: Dr. Fernando Fernández Polanco
Universidad de Valladolid, España

FFP.L

Vocal: Dra. María Isabel Estrada Alvarado
ITSON, México



Agradecimientos

Al doctor Jorge Gómez por su paciencia, por compartir sus conocimientos y experiencia.

A la doctora Anne-Calire Texier por su apoyo y dedicación, por sus acertadas sugerencias y por el tiempo compartido.

Al doctor Francisco Cervantes por su amistad, conducción y numerosos consejos. Por alentarme a cruzar nuevos horizontes.

A la doctora Flor Cuervo por todas sus recomendaciones y su profesional asesoría.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio W-103, por su amistad y las experiencias compartidas, especialmente a Citlali, Arturo, Felipe, Sergio, Emmanuel, Emir y a los tipitines David y Ricardo. Ha sido un gran placer compartir con ustedes.

Al personal y compañeros de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT) por recibirme en mi estancia con hospitalidad, por la atención y facilidades otorgadas.

A quienes compartieron conmigo no sólo un lugar de residencia y un lugar de trabajo, sino también la convivencia diaria: Ana, Nhun, Sonia, Pedro G., Gris, Marlin, Josué, Francisco G., Horacio, Alberto y Antonieta; su amistad y compañía, hicieron mi estancia más grata.

A mi familia y amigos sonorenses, quienes siempre han estado conmigo a pesar de la distancia. Por alentarme en los momentos difíciles. Los extrañé mucho.

A Moisés, por sus porras y compañía en esta odisea, por las ilusiones y los planes que ayudaron a reducir la distancia y por la nueva etapa que se avecina.

Dedicatorias:

A mi mamá

Por impulsarme a lograr mis metas

A mis hermanos

Por su compañía y aliento en todo momento

A Moisés

por su amor, comprensión

y apoyo incondicionales

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Impacto de la contaminación generada por contaminantes nitrogenados, azufrados y fenólicos sobre la salud pública y el medio ambiente	3
1.1.1 Compuestos nitrogenados	3
1.1.2 Compuestos azufrados	4
1.1.3 Compuestos fenólicos	5
1.2 Desnitrificación	6
1.2.1 Bioquímica de la desnitrificación	6
1.2.2 Desnitrificación organoheterótrofica	9
1.2.3 Desnitrificación litoautotrófica	11
1.2.4 Eliminación simultánea de compuestos de C, S y N por vía desnitrificante	12
1.3 Impacto de las quinonas en la biotransformación de diversos contaminantes	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	17
2.1 Justificación	17
2.2 Objetivos	18
2.2.1 Objetivos generales	18
2.2.2 Objetivos particulares	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Reactor continuo desnitrificante	19
3.2 Pruebas en lote	20
3.2.1 Proceso desnitrificante organotrófico en presencia de <i>p</i> -cresol y sulfuro	20
3.2.1.1 Ensayos en lote organotróficos con <i>p</i> -cresol como fuente de energía	20
3.2.1.2 Ensayos en lote organolitotróficos con <i>p</i> -cresol y 20 ppm de S ²⁻ como fuente alterna de energía	21
3.2.1.3 Ensayos en lote organolitotróficos con <i>p</i> -cresol y diferentes concentraciones de sulfuro como fuente de energía	22
3.2.2 Efecto de mediadores redox en el proceso desnitrificante organolitotrófico	22
3.2.2.1 Cultivos en lote, organotróficos y organolitotróficos, en presencia de diferentes mediadores redox	22

3.2.2.2 Cultivos en lote organolitotróficos con diferentes concentraciones de sulfuro en presencia de NQS	23
3.3 Métodos de análisis	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 Estabilización de un reactor desnitrificante alimentado con <i>p</i> -cresol y acetato como fuentes de carbono y energía	25
4.2 Cultivos en lote	27
4.2.1 Efecto del sulfuro en un proceso desnitrificante organotrófico con <i>p</i> -cresol como fuente de energía	28
4.2.2 Efecto de diferentes concentraciones de sulfuro en un proceso desnitrificante organotrófico, con <i>p</i> -cresol como fuente reductora	34
4.2.3 Efecto de mediadores redox sobre el proceso desnitrificante organolitotrófico ...	42
4.2.3.1 Efecto de tres quinonas en un proceso desnitrificante organolitotrófico	42
4.2.3.1.1 Estudio del efecto de la lawsona	43
4.2.3.1.2 Estudio del efecto de la AQDS	47
4.2.3.1.3 Estudio del efecto de la NQS	52
4.2.3.1.4 Comparación de los efectos de las tres quinonas sobre el proceso desnitrificante organolitotrófico	56
4.2.3.2 Efecto de la NQS en un proceso desnitrificante organolitotrófico con <i>p</i> -cresol y diferentes concentraciones de sulfuro como fuente de energía	58
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
6. REFERENCIAS	68
ANEXOS	75
A.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS	76
A.2 Publicación relacionada con la tesis	87
Meza-Escalante E.R., Texier A.-C., Cuervo-López F., Gómez J and Cervantes F.J. 2008. Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and <i>p</i> -cresol by a denitrifying sludge. <i>Journal of Chemical Technology and Biotechnology</i> . 83(3):372-377.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Niveles de peligrosidad asociados a diferentes concentraciones de H ₂ S	4
Tabla 1.2. Caracterización de sosa gastada de una refinería de México	6
Tabla 3.1. Medio de cultivo del reactor desnitrificante	19
Tabla 3.2. Composición de la solución de elementos traza	19
Tabla 4.1. Balance de compuestos carbonados y nitrogenados en el reactor UASB desnitrificante alimentado con acetato y <i>p</i> -cresol	26
Tabla 4.2. Velocidades específicas respiratorias (mg N o mg C/g SSV.d) utilizando <i>p</i> - cresol como fuente de electrones en ausencia y presencia de sulfuro	30
Tabla 4.3. Rendimientos de formación de productos del proceso desnitrificante con <i>p</i> - cresol como fuente de energía. en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro ...	36
Tabla 4.4. Balance de compuestos nitrogenados (en %) del proceso desnitrificante a diferentes concentraciones de sulfuro	39
Tabla 4.5. Velocidades específicas de consumo de sustratos del proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol como fuente de energía expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro ..	39
Tabla 4.6. Velocidades específicas de formación de productos del proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol como fuente de energía expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro	42
Tabla 4.7. Velocidades específicas respiratorias del cultivo organotrófico en presencia de lawsona	44
Tabla 4.8. Rendimientos de producción del cultivo organotrófico en ausencia y presencia de lawsona	44
Tabla 4.9. Velocidades específicas de consumo de sustrato del cultivo organolitotrófico en presencia de lawsona	47
Tabla 4.10. Velocidades específicas de formación de producto del cultivo organolitotrófico en presencia de lawsona	47
Tabla 4.11. Rendimientos de producción del cultivo organolitotrófico en ausencia y presencia de lawsona	47
Tabla 4.12. Velocidades específicas respiratorias del cultivo organotrófico en presencia de AQDS	48
Tabla 4.13. Rendimientos de producción del cultivo organotrófico en ausencia y	

presencia de AQDS	49
Tabla 4.14. Velocidades específicas de consumo de sustrato del cultivo organolitotrófico en presencia de AQDS	51
Tabla 4.15. Velocidades específicas de formación de producto del cultivo organolitotrófico en presencia de AQDS	51
Tabla 4.16. Rendimientos de producción del cultivo organolitotrófico en ausencia y presencia de AQDS	52
Tabla 4.17. Rendimientos de producción del cultivo organotrófico en ausencia y presencia de NQS	52
Tabla 4.18. Velocidades específicas respiratorias del cultivo organotrófico en presencia de NQS	53
Tabla 4.19. Velocidades específicas de consumo de sustrato del cultivo organolitotrófico en presencia de NQS	55
Tabla 4.20. Velocidades específicas de formación de producto del cultivo organolitotrófico en presencia de NQS	56
Tabla 4.21. Rendimientos de producción del cultivo organolitotrófico en ausencia y presencia de NQS	56
Tabla 4.22. Rendimientos de formación de productos del proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol como fuente de energía en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS	60
Tabla 4.23. Balance de compuestos nitrogenados (en %) del proceso desnitrificante a diferentes concentraciones de sulfuro en presencia de 500 μ M de NQS	62
Tabla 4.24. Velocidades específicas de consumo de sustratos del proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol como fuente de energía expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS	64
Tabla 4.25. Velocidades específicas de formación de productos del proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol como fuente de energía expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mecanismo para la eliminación simultánea de sulfuro y compuestos nitrogenados bajo condiciones desnitrificantes mediadas por quinonas	16
Figura 4.1. Perfiles de los compuestos carbonados y azufrados durante la oxidación de <i>p</i> -cresol: a) en ausencia de sulfuro y b) en presencia de sulfuro, en condiciones desnitrificantes	28
Figura 4.2. Actividades desnitrificantes obtenidas con <i>p</i> -cresol como fuente de electrones: a) en ausencia de sulfuro y b) en presencia de sulfuro	29
Figura 4.3. Perfiles de consumo de <i>p</i> -cresol en un proceso desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro	35
Figura 4.4. Perfiles de formación de los productos de la oxidación del <i>p</i> -cresol: a) C-HCO ₃ ⁻ y b) C-Intermediarios, en un proceso desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro	36
Figura 4.5. Perfiles de reducción de NO ₃ ⁻ en un proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro	37
Figura 4.6. Perfiles de consumo de S ²⁻ y formación de sulfato en un proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro	40
Figura 4.7. Ensayo en lote de <i>p</i> -cresol y nitrato con lawsona: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados	43
Figura 4.8. Ensayo en lote de <i>p</i> -cresol, sulfuro y nitrato con lawsona: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados	45
Figura 4.9. Perfiles de compuestos azufrados para el cultivo en lote organolitotrófico con lawsona	46
Figura 4.10. Ensayo en lote de <i>p</i> -cresol y nitrato con AQDS: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados	48
Figura 4.11. Ensayo en lote de <i>p</i> -cresol, sulfuro y nitrato con AQDS: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados	50
Figura 4.12. Perfiles de compuestos azufrados para el cultivo en lote organolitotrófico con AQDS	50
Figura 4.13. Ensayo en lote de <i>p</i> -cresol y nitrato con NQS: a) perfil de compuestos	

carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados	53
Figura 4.14. Ensayo en lote desnitrificante con <i>p</i> -cresol y sulfuro como fuente de energía en presencia de NQS: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados	54
Figura 4.15. Perfiles de compuestos azufrados para el cultivo en lote organolitotrófico con NQS	55
Figura 4.16. Porcentaje del efecto de las quinonas en las velocidades específicas respiratorias de los cultivos en lote desnitrificantes con <i>p</i> -cresol y sulfuro como fuente de energía, respecto a su correspondiente control sin quinona	57
Figura 4.17. Porcentaje del efecto de las quinonas en los rendimientos de formación de productos de los cultivos desnitrificantes con <i>p</i> -cresol y sulfuro como fuente de energía, respecto a su correspondiente control sin quinona	58
Figura 4.18. Perfiles de consumo de <i>p</i> -cresol en un proceso desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS	59
Figura 4.19. Perfiles de formación de los productos de la oxidación del <i>p</i> -cresol: a) C-HCO ₃ ⁻ y b) C-Intermediarios, en un proceso desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS	60
Figura 4.20. Perfiles de reducción de nitrato en un proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS	61
Figura 4.21. Perfiles de consumo de S ²⁻ y formación de sulfato en un proceso desnitrificante con <i>p</i> -cresol en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS	62
Figura 4.22. Porcentaje de recuperación de sulfato a diferentes concentraciones de sulfuro en presencia de 500 μ M de NQS	63

RESUMEN

Existen efluentes de diversos sectores industriales, como el químico y el petroquímico, que contienen una alta concentración de compuestos nitrogenados, azufrados y orgánicos, los cuales, pueden presentar velocidades de consumo bajas, en sistemas de tratamiento, debido a su recalcitrancia. Es de suma importancia encontrar procesos de tratamiento en los que se pueda llevar a cabo la eliminación conjunta de estos compuestos. Se ha observado la capacidad de microorganismos desnitrificantes de acoplar la oxidación de compuestos orgánicos y azufrados con la reducción de NO_3^- a N_2 . No obstante, la oxidación de algunos compuestos puede requerir de un largo tiempo para alcanzar la mineralización, por lo que es necesario buscar estrategias que permitan aumentar las tasas de conversión de dichos compuestos. Una alternativa es utilizar quinonas, ya que se ha reportado evidencia en la literatura, que han aumentado las velocidades de conversión de diferentes contaminantes, incluyendo sulfuro, nitrato y compuestos fenólicos, en procesos de oxidorreducción. Por lo tanto, es necesario estudiar el efecto de algunas quinonas en la fisiología de un proceso desnitrificante, para la eliminación simultánea de nitrato, sulfuro y *p*-cresol.

En este trabajo, se utilizó como fuente de inóculo para las pruebas en lote, biomasa estabilizada en un reactor UASB, en condiciones desnitrificantes con *p*-cresol y acetato como fuente de energía, a una relación C/N de 1.13. Durante la operación del reactor en continuo, se obtuvieron eficiencias de consumo de los sustratos mayores que 99% ($E_{p\text{-cresol}}$, E_{Acetato} y $E_{\text{NO}_3^-}$). Los principales productos formados fueron HCO_3^- y N_2 , obteniéndose rendimientos de $Y_{\text{HCO}_3^-} = 0.66 \pm 0.04$ y $Y_{\text{N}_2} = 0.88 \pm 0.04$.

Se evaluó el efecto del sulfuro sobre un proceso desnitrificante organotrófico, con *p*-cresol (44 mg *C-p*-cresol/L) como fuente de energía. Se realizaron cultivos en lote con concentraciones promedio de 25, 50 y 100 ppm de S^{2-} . La concentración de nitrato fue ajustada paralelamente a la del sulfuro para obtener relaciones estequiométricas entre la fuente oxidante y las reductoras. Las eficiencias de consumo de los tres sustratos ($E_{p\text{-cresol}}$, $E_{\text{S}^{2-}}$ y $E_{\text{NO}_3^-}$) fueron del 100%, excepto a 100 ppm de S^{2-} , en donde $E_{\text{NO}_3^-}$ fue $96.12 \pm 0.0001\%$. También, se observó que, conforme aumentó la concentración de sulfuro, la $q_{p\text{-cresol}}$ disminuyó, hasta ser 38% menor que el control sin sulfuro, a la concentración de 100 ppm de S^{2-} .

Las $q_{\text{NO}_3^-}$ fueron mayores que $q_{\text{NO}_2^-}$ en todos los casos, evidenciando que el paso más afectado del proceso fue la reducción de nitrito. Lo anterior, podría estar relacionado con la precipitación de metales (Cu y Fe), propiciada por el sulfuro, los cuales son esenciales para la enzima nitrito reductasa. También, se sugiere el efecto de los intermediarios azufrados (S^0), pues se ha reportado como un sustrato de lenta oxidación, lo que pudo haber limitado la transferencia de masa en el proceso, por la adhesión del S^0 en la biomasa. Los Y_{N_2} fueron menores que 1 en todos los ensayos. Los Y_{SO_4} fueron mayores que 0.9 hasta una concentración de 50 ppm de S^{2-} pero la oxidación completa hasta SO_4^{2-} fue casi nula a 100 ppm de S^{2-} .

En los cultivos en lote expuestos a 50 μM de diferentes quinonas, se observaron efectos heterogéneos sobre el proceso desnitrificante organolitotrófico con *p*-cresol y sulfuro. La lawsona disminuyó la mayoría de las velocidades específicas de proceso, pero favoreció los rendimientos de formación de productos. De manera contraria, la AQDS y NQS aumentaron de manera significativa la mayoría de las velocidades específicas, tanto de consumo de sustrato, como de formación de productos. En cambio, disminuyeron los Y_{N_2} . Sólo la NQS afectó de manera favorable la Y_{SO_4} . En todos los casos, las eficiencias de consumo ($E_{p\text{-cresol}}$, $E_{\text{S}^{2-}}$ y $E_{\text{NO}_3^-}$) fueron del 100%. La oxidación de sulfuro y *p*-cresol se llevó a cabo de manera simultánea.

Con base en los resultados anteriores, se seleccionó la NQS para evaluar su efecto en cultivos desnitrificantes expuestos a diferentes concentraciones de sulfuro. La concentración de quinona se aumentó a 500 μM . Se lograron eficiencias de consumo prácticamente del 100%, a excepción de $E_{\text{NO}_3^-}$ a 50 y 100 ppm de S^{2-} , las cuales fueron de 84.38 ± 0.015 y $74.95 \pm 0.004\%$, respectivamente. Los Y_{SO_4} disminuyeron conforme aumentó la concentración de sulfuro; además, fueron menores a los obtenidos en ausencia de la NQS, obteniéndose nuevamente un Y_{SO_4} mínimo a los 100 ppm de S^{2-} . Nuevamente, el proceso más afectado fue la reducción de nitrito, sugiriendo el efecto de los compuestos azufrados sobre esta etapa. Cabe señalar que esta concentración de quinona, favoreció la oxidación completa del *p*-cresol a HCO_3^- , lo que dio como resultado $Y_{\text{HCO}_3^-}$ cercanos a 1. Lo anterior, sugiere el efecto favorable de la NQS, a esta concentración aplicada, sobre la ruta de oxidación de *p*-cresol. Se obtuvieron q_{SO_4} menores que $q_{\text{S}^{2-}}$. Esto coincide con otros autores quienes señalan que la oxidación de los intermediarios azufrados es más lenta que la oxidación del S^{2-} , sugiriendo que el efecto del S^0 sobre el proceso estudiado fue mayor que el efecto del S^{2-} en si.

SUMMARY

Many industrial effluents, like those generated from the chemistry and petrochemical industries, contain a large diversity of nitrogenous, sulfurous and organic contaminants. Due to their recalcitrance, some of these pollutants present very low consumption rates in wastewater treatment systems. Therefore, an efficient and cost-effective treatment process is currently demanded to achieve the simultaneous removal of these compounds. The application of denitrifying microorganisms to oxidize organic and sulfurous compounds coupled to the reduction of nitrate to N_2 , has been observed. However, the oxidation of several aromatic compounds, through denitrification, requires long incubation times to achieve mineralization; thus, it is necessary to find strategies to increase the oxidation rates of these pollutants. An alternative is utilizing quinones, which have shown positive effects on the oxidation rates of several different contaminants. Consequently, the present study is proposed to evaluate the catalytic effects of different quinones on a denitrifying process in which simultaneous removal of nitrate, sulfide and *p*-cresol is carried out.

In this study the denitrifying sludge, which was utilized during batch experiments, was previously stabilized in a UASB reactor with *p*-cresol and acetate as electron donors at C/N ratio of 1.13. During steady state operation of the denitrifying reactor, the consumption efficiencies were higher than 99% ($E_{p\text{-cresol}}$, E_{Acetate} y $E_{\text{NO}_3^-}$). The main products obtained were HCO_3^- y N_2 with production yields of $Y_{\text{HCO}_3^-} = 0.66 \pm 0.04$ and $Y_{N_2} = 0.88 \pm 0.04$.

The effect of sulfide on an organotrophic denitrifying process, with *p*-cresol (44 mg C-*p*-cresol/L) as source of energy, was evaluated. Batch assays with concentrations of 25, 50 and 100 ppm S^{2-} were conducted. Nitrate concentration was simultaneously adjusted with the sulfide concentration to obtain the stoichiometric concentrations of electron donor and electron accepting substrates. It was achieved complete consumption of sulfide and *p*-cresol coupled to nitrate reduction, mainly to N_2 . Efficiencies of consumption for the three substrates ($E_{p\text{-cresol}}$, $E_{S^{2-}}$ y $E_{\text{NO}_3^-}$) were 100%, except for the experiments with 100 ppm de S^{2-} , in which the $E_{\text{NO}_3^-}$ was $96.12 \pm 0.0001\%$. It was observed a decrease of up to 38% on the $q_{p\text{-cresol}}$ by increasing the concentration of sulfide, compared to the control without sulfide.

The nitrate reduction rate ($q_{\text{NO}_3^-}$) was higher than nitrite reduction rate ($q_{\text{NO}_2^-}$) in all cases. Nitrite reduction was the most affected step. It is possible that precipitation of trace metals, such as Fe and Cu, which are essential components of denitrifying metalloenzymes, resulted from the addition of sulfide. In addition, it is suggested that elemental sulfur (S^0), which has been reported as slow-oxidizing substrate in denitrifying cultures, accumulated in the sludge incubations affecting the transfer of mass. Indeed, qualitative observations suggested the adsorption of S^0 onto the denitrifying biomass, which ultimately was reflected on the accumulation of nitrite in the cultures. The production yields of nitrogen molecular (Y_{N_2}) values were smaller than 1 in all experiments. The sulfate production yields ($Y_{\text{SO}_4^{2-}}$) were higher than 0.9 at concentrations ≤ 50 ppm S^{2-} , but the oxidation of S^{2-} to SO_4^{2-} was negligible at 100 ppm S^{2-} .

In batch assays conducted with 50 μM of different quinones, heterogeneous effects were obtained on an organo-lithotrophic denitrifying process with *p*-cresol and sulfide. Lawsone caused a diminishment of most consumption and production rates, but promoted favorable effects on the yields obtained. In contrast, AQDS and NQS significantly increased the respiratory rates observed, but the Y_{N_2} diminished. Only NQS affected positively the $Y_{\text{SO}_4^{2-}}$. Efficiencies of consumption ($E_{p\text{-cresol}}$, $E_{S^{2-}}$ y $E_{\text{NO}_3^-}$) were 100% in all cases. The oxidation of sulfide and *p*-cresol occurred simultaneously in the denitrifying cultures.

Considering these results, NQS was selected, as a redox mediator, to evaluate its catalytic effects with different concentrations of sulfide. The concentration of quinone was increased to 500 μM . Efficiencies of consumption were practically 100% in most cases, excluding the $E_{\text{NO}_3^-}$ obtained at 50 and 100 ppm S^{2-} , which were 84.38 ± 0.015 and $74.95 \pm 0.004\%$, respectively. The $Y_{\text{SO}_4=}$ diminished by increasing the sulfide concentration. Furthermore, the $Y_{\text{SO}_4=}$ achieved were smaller than yields obtained without NQS and a minimum value of $Y_{\text{SO}_4=}$ was observed at 100 ppm S^{2-} . For a second time, nitrite reduction was the most affected step in the denitrifying process, suggesting the inhibitory effect of sulfurous compounds over this step. It is important to mention that this concentration of NQS had a favorable effect on the complete oxidation of *p*-cresol to HCO_3^- , resulting in a $Y_{\text{HCO}_3^-}$ value close to 1. The smaller values of $q_{\text{SO}_4=}$ obtained, compared to $q_{\text{S}^{2-}}$ values, agree with preliminary studies reporting slower oxidation rate of sulfurous intermediates to sulfate than the sulfide oxidation rate, suggesting a greater effect of S^0 than that attributed to sulfide.

1. INTRODUCCIÓN

Poca cantidad del agua de la tierra es directamente utilizable para las actividades humanas, ya que la mayor parte está en forma salina o congelada. Según Vitousek y col. (1997), el hombre actual utiliza más de la mitad del agua fresca disponible y alrededor del 70% de ésta, se aplica en la agricultura. Asimismo, las prácticas agrícolas han originado la introducción masiva de nitrógeno en suelos y aguas, causando deterioros y desequilibrio para el ambiente (Smil, 1997; Pérez, 1998; Richardson, 2000). Aunado a la descarga de compuestos nitrogenados al ambiente, se encuentran otros compuestos de gran importancia por sus implicaciones ambientales, como los compuestos azufrados y los compuestos orgánicos, algunos de éstos considerados recalcitrantes. Los problemas ambientales generados por los compuestos azufrados son las emisiones de SO_2 y H_2S producidos, en mayor medida, por actividades antropogénicas (Janssen, 1996).

La contaminación por compuestos con C, N y S en aguas es un problema crítico. Ciertos tipos de aguas residuales, como las provenientes de la industria del petróleo, representan un gran desafío para su tratamiento, antes de su descarga, debido a su complejidad química (Reyes-Avila y col., 2004). En estos efluentes se puede encontrar altas concentraciones de contaminantes orgánicos, como compuestos fenólicos, compuestos azufrados y nitrogenados en menor proporción (Puig-Grajales y col., 2003; Razo-Flores y col., 2003; Olmos y col., 2004). Los compuestos fenólicos son contaminantes peligrosos y están presentes en muchos efluentes industriales (Heesche y col., 1999).

Dentro de las implicaciones que puede tener la descarga de compuestos nitrogenados, azufrados y fenólicos, se encuentran las de tipo ambiental, económicas y de la salud, como son:

- a) Eutroficación de lagos y estuarios (Delwich y Bryan, 1976; Vitousek y col., 1997; Conrado y col., 1999; Prescott y col., 1999; Cervantes-Carrillo y col., 2000; Pérez, 2000; Du y col., 2003),
 - b) Contaminación de aguas subterráneas (Smil, 1997),
 - c) Toxicidad y carcinogenicidad (Mateju y col., 1992; Conrado y col., 1999; Puig-Grajales y col., 2003),
 - d) Cambio climático (Delwiche y Bryan, 1976; Wicht, 1996; Smil, 1997; Pérez, 1998; Park y col., 2002).
-

La desnitrificación biológica es altamente selectiva para la eliminación de nitrato de materia orgánica y compuestos reducidos del azufre. La desnitrificación puede ser definida como un proceso respiratorio en el cual el nitrato es reducido a nitrógeno molecular, ligado a la oxidación de materia orgánica a CO_2 o de compuestos azufrados reducidos (S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S^0) a sulfato. La eficiencia de eliminación de nitrato, así como el rendimiento de conversión a N_2 del proceso, pueden ser muy altos y alcanzar valores cercanos al 100%. Los procesos fisicoquímicos para la reducción de nitrato pueden alcanzar también eficiencias altas, pero con un alto costo de operación y el requerimiento de disposición final de desechos, por lo que no representan una solución efectiva, ya que sólo trasladan el problema de un lugar a otro (Mateju y col., 1992; Reyes, 2000; Cadena, 2004).

La desnitrificación puede ser de 2 tipos, de acuerdo con el donador de electrones: la desnitrificación organotrófica y la litotrófica. En el caso de la organotrófica, el donador de electrones puede ser una fuente orgánica como metanol, etanol, acetato, etc.; mientras que en el caso de litotrofia, el donador de electrones es de tipo inorgánico como H_2 , S^{2-} , FeS , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y S^0 (Bernet y col., 1995; Trouve y col., 1998; Cuervo y col., 1999; Prescott y col., 1999; Madigan y col., 2001; Park y col., 2002; Sierra-Alvarez y col., 2005; Manconi y col., 2006; Cardoso y col., 2006). Existen evidencias de que se puede llevar a cabo la oxidación de compuestos aromáticos, como *p*-xileno, benceno, fenol y *p*-cresol, en condiciones anaerobias acoplada a la desnitrificación (Häner y col., 1995; Aneez y Kunhi, 1999; Burland y Edwards, 1999; Fang y Zhou, 1999; Heesche y col., 1999; Cadena, 2004; Sierra-Alvarez y col., 2005).

Respecto a la eliminación de compuestos azufrados como H_2S , los métodos fisicoquímicos existentes también requieren de una gran inversión y altos costos de operación; en cambio, los procesos microbiológicos pueden reducir esos costos, con la posibilidad de darles además un valor agregado a sus productos finales (Janssen, 1996). Reyes (2000) señaló que la oxidación de sulfuro acoplada a la desnitrificación, en presencia de acetato, presentó buenos rendimientos de producción de N_2 , CO_2 y S^0 , lo que sugiere su posible aplicación en el tratamiento de aguas residuales de la industria del petróleo.

Como se ha señalado anteriormente, el proceso desnitrificante lleva a cabo la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos, aún de compuestos de difícil oxidación, como los compuestos aromáticos, los cuales, pueden presentar velocidades de consumo y oxidación bajas. Existe escasa información sobre las tasas de consumo de este tipo de compuestos, en particular de los compuestos fenólicos en un proceso desnitrificante, inclusive,

información donde se describa el efecto de sulfuro sobre el proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía. Por lo tanto, es necesario contar con estudios del proceso desnitrificante en condiciones organotróficas, e identificar las posibles etapas limitantes en el proceso por la presencia conjunta de *p*-cresol y sulfuro en el proceso desnitrificante.

Para favorecer la oxidación de *p*-cresol y sulfuro, se han realizado en los últimos años trabajos en diferentes procesos anaerobios, en presencia de sustancias húmicas o de quinonas. Las quinonas son sustancias reconocidas por su actividad oxido-reductiva en procesos biológicos, con diversos contaminantes, incluyendo el tolueno, fenol, *p*-cresol y sulfuro, logrando en algunos estudios aumentar las velocidades de oxidación (Cervantes y col., 2000b; Cervantes-Carrillo, 2002; Cadena, 2004). Sin embargo, existen muy pocos estudios que reporten el impacto de las quinonas en procesos desnitrificantes y más aún en la eliminación simultánea de compuestos fenólicos y sulfuro.

1.1 Impacto de la contaminación generada por contaminantes nitrogenados, azufrados y fenólicos sobre la salud pública y el medio ambiente.

1.1.1 Compuestos nitrogenados.

La alteración del ciclo del nitrógeno, ocasionada principalmente por actividades antropogénicas, ha tenido múltiples consecuencias:

a) En la atmósfera

Los óxidos nitrosos son asociados con el efecto invernadero y el agotamiento del ozono estratosférico (Delwiche y Bryan, 1976; Smil, 1997; Conrado y col., 1999). Park y col. (2002) mencionan que el N₂O tiene 230 veces más capacidad de almacenar calor que el CO₂, en consecuencia, en el calentamiento global. Por otra parte, Wicht (1996) afirma que la concentración de este gas está aumentando a una tasa de 0.25% cada año. Además, se le atribuye, en parte, la formación de la lluvia ácida y de gases (“smog”) que afligen las áreas urbanas y agrícolas en el mundo (Vitousek y col. 1997). Un proceso desnitrificante mal controlado puede contribuir de manera significativa en la generación de N₂O.

b) En la salud

Altos niveles de nitrato han sido asociados con la metahemoglobinemia y cáncer gástrico debido a la formación endógena de compuestos genotóxicos por las bacterias del tracto gastrointestinal (Mateju y col., 1992; Conrado y col., 1999). Por otra parte, el nitrito, al

contacto con la saliva puede formar nitrosaminas, las cuales son cancerígenas (Mateju y col., 1992; Pérez, 1998; Cuervo, 2003).

c) En cuerpos de agua

El nitrógeno contenido en los fertilizantes puede infiltrarse y llegar al agua subterránea o, por escurrimiento, llegar a lagunas o zonas costeras. De este último, se deriva un problema prominente el cual se conoce como eutroficación de los cuerpos receptores de aguas contaminadas con altos contenidos de nitrógeno (Delwich y Bryan, 1976; Smil, 1997; Vitousek y col., 1997; Conrado y col., 1999; Prescott y col., 1999; Pérez, 2000; Du y col., 2003).

1.1.2 Compuestos azufrados.

La descarga de contaminantes azufrados al medio ambiente ha generado múltiples problemas:

a) En la atmósfera

La liberación de SO_2 a la atmósfera puede ocasionar la lluvia ácida (Janssen, 1996; Reyes, 2000; Beristain, 2004). Janssen (1996) señala que la combustión de combustibles fósiles representa el 90% de la emisión global de SO_2 realizada por el hombre. En el caso de la liberación de H_2S a la atmósfera, ésta origina malos olores a partir de una concentración de 1 ppm (Janssen, 1996; Shibata y Kobayashi, 2001).

b) En la salud

En la Tabla 1.1 se muestran los niveles de H_2S considerados como peligrosos y sus efectos en el ser humano.

Tabla 1.1. Niveles de peligrosidad asociados a diferentes concentraciones de H_2S .

Concentración (ppm)	
10	Exposición laboral limitada a 8 horas
20	Requiere de cubrebocas
100	Puede causar dolor de cabeza, náusea, sensación de pérdida de olor
200	Rápida pérdida del sentido del olfato, irritación de ojos y garganta
500	Pérdida de razonamiento y equilibrio, auxilio en respiración en 200 minutos
700	Inmediata inconsciencia, se paraliza la respiración

Fuente: Janssen A.J.H. (1996).

Como puede observarse, el sulfuro puede ocasionar diferentes trastornos en el hombre, los cuales dependen de la concentración y el tiempo al que se estuvo expuesto. En Estados Unidos, los límites de exposición de un trabajador a sulfuro son 10 ppm, llegando a ser letal a una concentración de 600 ppm (Janssen 1996).

c) Otros efectos

Cabe señalar que uno de los problemas que ocasiona el H₂S se presenta en el área industrial debido a la corrosión en equipos y tuberías que ocasiona (Telang y col., 1999; Vaiopoulou y col., 2005; Cardoso y col., 2006). El sulfuro contenido en las aguas residuales es generado por industrias como plantas petroquímicas, curtidurías, manufactura de rayón y como resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales. Últimamente es generado principalmente por industrias de pulpa y papel (Janssen 1996; Olmos y col., 2004; Reyes-Avila y col., 2004; Manconi y col., 2006; Vaiopoulou y col., 2005).

1.1.3 Compuestos fenólicos.

La descarga de compuestos fenólicos ha ocasionado impactos negativos principalmente sobre los siguientes rubros:

a) En la salud

Los compuestos fenólicos tienen principalmente implicaciones en el área de la salud, ya que son considerados como carcinogénicos, además de ser altamente tóxicos para los seres vivos (Fang y Zhou, 1999; Heesche y col., 1999; Atuanya y col., 2000; Puig-Grajales y col., 2003; Olmos y col., 2004). El fenol parece ser reconocido como tóxico o letal en peces a concentraciones de 5 a 25 mg/L (Cervantes y col., 2000b, Razo-Flores y col., 2003).

b) En aguas residuales

Las aguas contaminadas por compuestos fenólicos son originadas por industrias químicas, farmacéuticas, textiles, así como industrias de plata, plásticos, preservación de la madera, fábricas de refrescos, procesos de carbonatación, entre otros (Aneez y Kunhi, 1999; Heesche y col., 1999; Razo-Flores y col., 2003). Las aguas residuales de una refinería son mezclas complejas de compuestos orgánicos e inorgánicos. Frecuentemente contienen más de un tipo de compuestos fenólicos. El fenol y los diferentes isómeros del cresol son los principales constituyentes encontrados en efluentes de refinerías. A continuación la Tabla 1.2 presenta la caracterización del producto del proceso de desulfuración en una refinería del país.

Tabla 1.2. Caracterización de sosa gastada de una refinería de México (Olmos y col., 2004).

	DQO (g/L)
pH	13
DQOs ^a	320.1
Fenol	78
<i>o</i> -Cresol	15.95
<i>p</i> -Cresol	47.72
3,4-Dimetilfenol	3.83
2,5-Dimetilfenol	7.88
Sulfuros	114.08
DQOs calc ^b	267.46

^aDQOs: Demanda Química de Oxígeno soluble

^bDQOs calc: Demanda Química de Oxígeno soluble debida a los compuestos fenólicos y a sulfuros

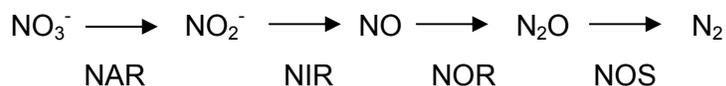
Como puede observarse, el 84 % de la DQO soluble es debido a la DQO de los compuestos fenólicos y sulfuros.

1.2 Desnitrificación.

Se llama desnitrificación (la organoheterotrófica y la litoautotrófica) al proceso de respiración anóxica en el cual el nitrato o nitrito son reducidos a compuestos nitrogenados gaseosos, finalmente a N₂ (Knowles, 1982; Carr y col., 1989; Mateju y col., 1992; Bernet y col., 1995; Zumft, 1997; Richardson y Watmough, 1999; Richardson, 2000; Madigan y col., 2001; Du y col., 2003).

1.2.1 Bioquímica de la desnitrificación.

Cada paso de la ruta metabólica desnitrificante es catalizado por una enzima distinta, que ocurre de manera secuenciada de la siguiente manera:



❖ Reducción de nitrato a nitrito:

La reducción de nitrato a nitrito está representada en la siguiente reacción:



La reducción desasimilativa de nitrato a nitrito es llevada a cabo por la nitrato reductasa (NAR). Mateju y col. (1992) señalan que esta enzima se encuentra en la membrana. Autores

como Knowles (1982) y Rustrian y col. (1997) mencionan la presencia de 2 NAR, una asimilativa y otra desasimilativa. Jetten y col. (1997) mencionan también que se han identificado 2 tipos de nitrato reductasa, una membranal de tres subunidades (120, 60 y 20 kDa), que emplea ubihidroquinona en el transporte de electrones y la otra es una enzima soluble que se localiza en el periplasma y se compone de dos subunidades (94 y 19 kDa). Ambas enzimas contienen molibdeno como cofactor.

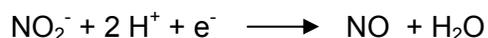
Por su parte, Zumft (1997) hace una descripción detallada de la bioquímica de la desnitrificación y señala que existen bacterias como *Paracoccus denitrificans* que cuentan con tres tipos de nitrato reductasa; dos desasimilativas, que están ligadas a los sistemas respiratorios de transporte de electrones y una enzima asimilativa. La presencia de tres nitrato reductasas es afirmada también por Richardson y Watmough (1999), Richardson (2000), Conrado y col. (1999) y Cuervo (2003). Las características de estas enzimas son:

- a) NAS: Enzima citoplasmática asociada a la asimilación del nitrógeno, considerada como amonio represible (Richardson y Watmough, 1999; Richardson, 2000). Se han encontrado en las bacterias dos clases de NAS: la ferredoxina y una enzima dependiente del NADH. Ambas enzimas contienen al molibdeno en la forma de cofactor MGD (molibdopterina guanina dinucleótido). Debido a la localización citoplasmática de la enzima NAS, la reducción de nitrato es precedida por su transporte dentro de la célula (Conrado y col., 1999).
- b) NAR: Estas enzimas están compuestas de tres subunidades: una subunidad catalítica α (NarG), una subunidad soluble β (NarH) y una membrana bihemo b quinol oxidante γ (NarI). Las subunidades α y β son ancladas al lado citoplasmático de la membrana por la subunidad γ y puede ser solubilizada por detergentes o calor. El nitrato tiene que ser transportado dentro de la célula antes de ser reducido (por la localización del sitio activo de NarG) y el nitrito es usualmente excretado al periplasma por un sistema de extrusión específico. Esta acoplada a la generación de fuerza motriz transmembranal. Todas las NAR pueden reducir clorato y son inhibidas por azida, cianuro y tiocianato (Conrado y col., 1999).
- c) NAP: El rol fisiológico de NAP puede variar en diferentes organismos o en la misma bacteria bajo diferentes condiciones metabólicas. Dentro de los roles se encuentran la adaptación de metabolismo anaerobio después de transición de condiciones aerobias y servir como mecanismo de autodefensa formando niveles altos de nitrito

para inhibir el crecimiento de una bacteria de competencia. No está acoplada a la generación de fuerza motriz transmembranal debido a su localización en el periplasma (Conrado y col., 1999; Richardson y Watmough, 1999).

❖ Reducción de nitrito a óxido nítrico:

La reducción de nitrito a óxido nítrico se representa en la siguiente reacción:



La reducción desasimilatoria del nitrito es llevada a cabo por dos nitrito reductasas distintas, cd_1 NIR y Cu NIR. La Cu NIR contiene cobre en su centro y la cd_1 NIR contiene 2 hemo (Knowles, 1982; Mateju y col., 1992). Ambas parecen llevar a cabo la misma reacción fisiológica, pero se consideran mutuamente excluyentes. El óxido nítrico, NO, es típicamente producido a partir del nitrito, pero bajo algunas condiciones se produce el N_2O . Las nitrito reductasas se encuentran en la parte interna de la membrana así como en el periplasma. Las primeras sólo se expresan en condiciones anaerobias mientras que las periplásmicas se activan en presencia de oxígeno (Knowles, 1982; Mateju y col., 1992; Richardson y Watmough, 1999; Cuervo, 2003). Se reporta que esta enzima puede ser inhibida por CN^- y por su producto NO, aunque la inhibición por NO parece que se presenta de manera diferente en las especies desnitrificantes. Además, la pueden afectar factores como los cambios de pH del medio de cultivo, la concentración de nitrito, la presencia de nitrato, las características cinéticas de las reductasas y los intermediarios de las fuentes orgánicas reductoras (Cuervo, 2003).

❖ Reducción de óxido nítrico a óxido nitroso:

Estas enzimas catalizan la reducción de NO a N_2O como se muestra en la reacción: (Richardson y Watmough, 1999)



Cervantes-Carrillo y col. (2000) señalan que la óxido nítrico reductasa (NOR) es la enzima menos caracterizada asociada con la desnitrificación, pero se sabe que es una enzima membranal y que se compone de dos subunidades, una de 16 kDa conteniendo hemo c y otra con hemo b de 53 kDa. Se considera un paso obligatorio en el proceso y se ha encontrado que bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. denitrificans* y *P. perfectomarinus* pueden reducir el NO a N_2O (Knowles, 1982).

Zumft (1997) señala que el NO es tóxico cuando está presente en exceso y que aunque el metabolismo de NO es innato de las desnitrificantes, el compuesto es tóxico también para este grupo de bacterias. Agrega que la cantidad de NO formado durante la desnitrificación depende del organismo, las condiciones del cultivo y también del método de ensayo.

Existe una afinidad muy fuerte entre esta enzima y el sustrato, la reducción a bajas concentraciones se lleva a cabo de forma inmediata en el periplasma, de forma tal que su producción como su consumo se lleva a cabo de manera extracelular. La actividad de esta enzima puede ser disminuida por algunos detergentes y ácidos grasos volátiles e inhibida por ionóforos, azida, cloranfenicol, nitrito y por el mismo NO (Cuervo, 2003).

❖ Reducción de óxido nitroso a nitrógeno molecular:

La reducción de N_2O a N_2 se representa en siguiente reacción: (Jetten y col., 1997)



El último paso de la desnitrificación es la reducción del N_2O a N_2 y es catalizada por la óxido nitroso reductasa (NAS). Este paso está acoplado a la formación de ATP (Mateju y col., 1992). La NOS es una enzima periplásmica, dimérica que contiene 4 átomos de Cu por monómero, de 70 kDa cada dímero (Richardson y Watmough, 1999, Cervantes-Carrillo y col., 2000).

Esta enzima es inhibida por acetileno, monóxido de carbono, azida, cianida, tiocianato; además es sensible al O_2 y a sales comunes (Knowles, 1987; Jetten y col., 1997; Cuervo, 2003). Mateju y col. (1992) señalan que aún se sabe poco acerca de la interdependencia regulativa de la reductasa involucrada, a pesar de haberse investigado con detalle la influencia de factores como la concentración de oxígeno, pH, temperatura, donador de electrones y la concentración de nitrato e intermediarios en el desarrollo de la desnitrificación en algunas especies bacterianas.

1.2.2 Desnitrificación organoheterotrófica.

En la desnitrificación organoheterotrófica, las bacterias requieren de un donador de electrones de tipo orgánico que sirve también como fuente de carbono (Mateju y col., 1992; Bernet y col., 1995; Zumft, 1997; Prescott y col., 1999; Cervantes-Carrillo y col., 2000; Madigan y col., 2001; Park y col., 2002).

Una amplia variedad de compuestos orgánicos han sido usados en la desnitrificación, tales como metanol, etanol, glucosa, glicerol, ácido succínico, acetato, metano, aspartato, ácido

fórmico, entre otros (Bernet y col., 1995; Constantin y Fick, 1997; Rustrian y col., 1997; Cervantes y col., 2001; Cuervo, 2003; Islas, 2004). En los últimos años se ha demostrado que las bacterias desnitrificantes pueden consumir compuestos de difícil consumo y oxidación, conocidos como recalcitrantes, como los derivados del petróleo y los plaguicidas. Se pueden mencionar los siguientes: *p*-xileno (Häner y col., 1995), benceno (Burland y Edwards, 1999), fenol (Heesche y col., 1999; Fang y Zhou, 1999) y *p*-cresol (Cadena, 2004; Sierra-Alvarez y col., 2005).

Uno de los factores que determina el proceso que se llevará a cabo, es la relación C/N. A valores bajos, se favorece la desnitrificación. En cambio, a valores altos de C/N predomina la formación de amonio vía reducción desasimilativa de nitrato (RDNA), ya que al limitarse los aceptores de electrones (el nitrato), se favorece la vía que permite un mayor grado de reducción (Akunna y col., 1994; Cervantes y col., 1999). Akunna y col. (1994) encontraron en un trabajo realizado con glucosa como fuente de energía, que a una C/N menor que 3 se llevó a cabo el proceso desnitrificante. De igual manera, a una relación C/N entre 3.5 y 21.3 se efectuó la desnitrificación, conjuntamente se observó la formación de metano. Finalmente, cuando la C/N fue mayor que 21.3, se generó metano sin presentarse la desnitrificación. Esta relación C/N, es igualmente señalada como uno de los principales parámetros que tienen impacto en la acumulación de intermediarios en un proceso desnitrificante (Cervantes y col., 1998; Cervantes y col., 1999; Cervantes y col., 2001). Se señala además, que es posible que la ruta de reducción del nitrato esté determinada por el tipo de fuente reductora (Cervantes y col., 2001).

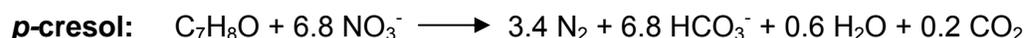
La estequiometría para la desnitrificación organotrófica en el caso de diferentes donadores de electrones, se muestra en las siguientes reacciones:



$$\Delta G^{\circ'} = -791.9 \text{ kJ/reacción}$$



$$\Delta G^{\circ'} = -5968.3 \text{ kJ/reacción}$$



$$\Delta G^{\circ'} = -2095.4 \text{ kJ/reacción}$$

Los valores de ΔG° para los diferentes sustratos orgánicos mostrados, indican que las reacciones son favorables desde el punto de vista termodinámico. La relación C/N estequiométrica para llevar a cabo la oxidación del *p*-cresol a CO₂, sin considerar la producción de biomasa, tiene un valor de 0.88.

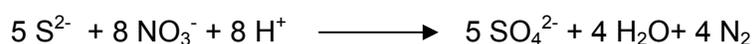
1.2.3 Desnitrificación litoautotrófica.

En la desnitrificación litoautotrófica, se ha observado que algunas bacterias desnitrificantes pueden emplear compuestos inorgánicos como fuente de electrones y fijar el CO₂ como fuente de carbono. El hidrógeno o varios compuestos reducidos de azufre tales como S⁰, S²⁻, S₂O₃²⁻, S₄O₂²⁻ o SO₃²⁻ pueden ser usados como fuentes de energía. Otras bacterias pueden utilizar hierro ferroso como fuente de energía para la desnitrificación litoautotrófica (Mateju y col., 1992; Cervantes-Carrillo y col., 2000; Reyes, 2000; Madigan y col., 2001; Park y col., 2002; Sierra-Alvarez y col., 2005; Cardoso y col., 2006; Aranda-Tamaura y col., 2007).

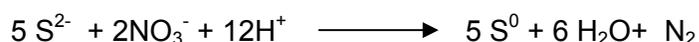
Mateju y col. (1992) reportaron que la relación S/N influye fuertemente en la desnitrificación litoautotrófica. Cuando la relación S/N es baja, observaron que ocurre la acumulación de nitrito y está limitada la conversión a N₂. La relación mínima calculada es de 1.30 con tiosulfato como fuente de energía. Cuando se cuenta con una relación S/N suficientemente alta, no se observó la acumulación de nitrito. Estos resultados coinciden con lo observado por Cardoso y col. (2006).

Tugtas y Pavlostathis (2007) mencionan la importancia de la eliminación conjunta de nitrato y sulfuro indicando que esto tendría ventajas de disminución de espacio y costos. Vaiopoulou y col. (2005) muestran también que se puede llevar a cabo la oxidación anóxica en combinación de desnitrificación y que a concentraciones estequiométricas, el sulfuro se oxida hasta sulfato.

A continuación se muestra la estequiometría de un proceso desnitrificante utilizando sulfuro como donador inorgánico de electrones en la que se puede observar que el sulfuro puede ser oxidado a azufre elemental o a sulfato:



$$\Delta G^{\circ} = -3891.32 \text{ kJ/reacción}$$



$$\Delta G^{\circ} = -1151.38 \text{ kJ/reacción}$$

La relación S/N estequiométrica para llevar a cabo la oxidación completa del sulfuro al sulfato es 1.43. La conversión del sulfuro a sulfato consume 4 veces más nitrato que el comparado a llevar a cabo la oxidación azufre elemental. Los valores de ΔG° para ambas reacciones indican que las reacciones son favorables desde el punto de vista termodinámico. Se ha puesto poca atención a los efectos que pudiera tener el sulfuro sobre las enzimas involucradas en la desnitrificación. El sulfuro es un compuesto muy tóxico para diferentes microorganismos, aún a concentraciones tan bajas como 10 mg/L, pero los niveles inhibitorios del sulfuro dependen de las especies microbianas, de la concentración celular, pH, temperatura y el tipo de sustrato utilizado (Speece, 1996; Tugtas y Pavlostathis, 2007). Sin embargo, la literatura no provee evidencia concluyente acerca de cuál paso es el más vulnerable a los efectos inhibitorios del sulfuro. Varios estudios describen un efecto inhibitorio del sulfuro en los últimos pasos de la desnitrificación, causando consecuentemente, la liberación al ambiente de N_2O y NO (Sørensen y col., 1980; Gommers y col., 1988; Schönharting y col., 1998; Guerrero, 2007). En contraste, algunos estudios reportaron sólo la acumulación de nitrito a diferentes concentraciones de sulfuro (Reyes-Avila y col., 2004; Trouve y col., 1998; Sierra-Alvarez y col., 2005; Cardoso y col., 2006; Guerrero, 2007). Por otro lado, Reyes-Avila y col. (2004) sugieren un efecto tóxico del sulfuro debido a la presencia de 104 mg S^{2-}/L en un proceso desnitrificante litotrófico en lote, pues observaron una disminución de la tasa de desnitrificación aunque señalan que es debida a una baja tasa de oxidación del sulfuro a sulfato. De igual manera, Cardoso y col. (2006) observaron un efecto inhibitorio del sulfuro en un proceso desnitrificante litotrófico, reflejado en la disminución en un orden de 21 veces de la velocidad específica de consumo de NO_3^- al incrementar la concentración del sulfuro de 80 a 320 mg S^{2-}/L .

1.2.4 Eliminación simultánea de C, S y N por vía desnitrificante.

Se han realizado trabajos en desnitrificación organoheterotrófica y litoautotrófica, pero existen muy pocos trabajos en procesos desnitrificantes donde se presente la combinación de fuentes de electrones orgánica e inorgánica, como puede ser el caso de varios efluentes de tipo industrial. Reyes (2000) y Beristain (2004) realizaron estudios de desnitrificación con acetato y sulfuro (desnitrificación organolitotrófica), cada uno en un tipo de reactor diferente obteniendo ambos, eficiencias de eliminación de nitrato y sulfuro cercanas al 100 %. Ambos autores recomiendan este tipo de procesos para la eliminación simultánea de C, N y S, obteniendo eficiencias de consumo de los contaminantes mayores al 99%. Hacen además

hincapié en la necesidad de estudios posteriores pues no existe información suficiente en cuanto al uso de sulfuro como fuente de energía en un proceso desnitrificante.

Reyes-Avila y col. (2004) observaron que al estar en mezcla los 3 compuestos (NO_3^- , acetato y sulfuro) en un proceso desnitrificante, en continuo, en un reactor de tanque agitado, el consumo de NO_3^- no varió en presencia de sulfuro, pero sí la producción de N_2 , aunque se obtuvieron rendimientos de formación de N_2 (Y_{N_2}) mayores que 0.8. Cabe señalar que la eficiencia de consumo de acetato, utilizado como fuente de carbono, disminuyó al 65% cuando se utilizó una velocidad de carga de 294 mg $\text{S}^{2-}/\text{L d}$.

Por otra parte, Sierra-Alvarez y col. (2005) utilizaron un reactor UASB en presencia de los tres compuestos (C, N, S) pero en esta ocasión el compuesto carbonado utilizado fue *p*-cresol, mostrando la capacidad de llevar a cabo la oxidación simultánea de sulfuro y compuestos fenólicos por un proceso desnitrificante pues obtuvieron eficiencias de consumo de los tres contaminantes mayores al 91%.

En estudios posteriores, Cardoso y col. (2006) observaron que al agregar una concentración de 0.5 mM de acetato a un proceso litotrófico desnitrificante con sulfuro como fuente de energía, las velocidades específicas de consumo de NO_3^- y de formación de SO_4^{2-} aumentaron 23.3% y 25.3%, respectivamente. Estos resultados apoyan la idea de que es posible la eliminación simultánea de compuestos carbonados y azufrados por desnitrificación.

Por su parte, Tugtas y Pavlostathis (2007) observaron que la adición de sulfuro a cultivos metanogénicos inhibió la metanogénesis y se llevó a cabo la reducción de nitrato, aunque con la acumulación de intermediarios como: NO_2^- , NO, N_2O . Señalan además, que el grado de inhibición del proceso metanogénico depende de la concentración de sulfuro libre, del pH, de la temperatura y de la relación DQO/N.

Los parámetros cinéticos disponibles en la literatura no revelan claramente las limitaciones de la aplicabilidad de la desnitrificación en la eliminación simultánea de sulfuro y compuestos orgánicos. Además, los efectos inhibitorios del sulfuro en su eliminación simultánea con *p*-cresol no han sido bien estudiados, por lo que es de considerable importancia el realizar este tipo de trabajos para dar mejor respuesta a la eliminación conjunta de nitrógeno, sulfuro y compuestos fenólicos, los cuales se encuentran de manera conjunta en algunos efluentes industriales (Reyes-Avila y col., 2004; Sierra-Alvarez y col., 2005).

1.3 Impacto de las quinonas en la biotransformación de diversos contaminantes.

Las sustancias húmicas son una clase químicamente heterogénea de compuestos orgánicos poliméricos que contienen grupos funcionales, como las quinonas, con propiedades de óxido-reducción (redox) y tienen la habilidad de formar complejos humus-metal (Kappler y col., 2004). Las sustancias húmicas pueden servir como aceptores de electrones en la respiración anaerobia de microorganismos por lo que la reducción microbiana de humus llega a ser ecológicamente relevante debido a que puede servir como un importante mecanismo para la oxidación de sustratos orgánicos en muchos ambientes anaerobios debido a que las sustancias húmicas son la forma de materia orgánica más abundante en muchos suelos y sedimentos (Lovley y col., 1999; Cervantes y col., 2002; Kappler y col., 2004). Se sugiere que pueden llegar a ser un aceptor de electrones importante para la oxidación de la materia orgánica debido a que las quinonas pueden ser reutilizadas como aceptor de electrones múltiples veces, cuando existen mecanismos de reoxidación (Lovley and Blunt-Harris, 1999; Lovley y col., 1999). Bajo ese esquema, las quinonas pueden ser utilizadas a concentraciones por debajo de la estequiométrica (Field y col., 2000).

Las quinonas son unidades estructurales importantes presentes en el humus. El contenido de quinonas en el humus fue correlacionado, en varios estudios, con la capacidad del humus de aceptar electrones, pues se encontró que los microorganismos que tienen la habilidad de transferir electrones a las sustancias húmicas invariablemente tienen la habilidad de transferir electrones a las quinonas extracelulares. En efecto, se reportó que muchos inóculos originados de plantas de tratamiento de aguas residuales, sedimentos marinos, sedimentos contaminados o ricos en materia orgánica y suelos con diferentes características pudieron oxidar una gran variedad de sustratos acoplado a la reducción de sustancias húmicas (Cervantes-Carrillo y col., 2000; Coates y col., 1998). La antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) y su forma reducida, antrahidroquinona-2,6-disulfonato (AH₂QDS), han sido utilizadas en diversos trabajos como quinona modelo (Lovley y col., 1999; Cervantes y col., 2002; Coates y col., 2002; Field y Cervantes, 2005; Cervantes y col., 2008). Se ha encontrado que la mayoría de los microorganismos reductores de humus también son capaces de reducir AQDS a AH₂QDS, por lo que las quinonas se consideran buenos análogos en la función del humus como aceptores finales de electrones (Lovley y Blunt-Harris, 1999; Cervantes y col., 2000a; Field y col., 2000; Cervantes y col., 2002).

Se atribuyen diferentes funciones a las quinonas, en ambientes anaerobios, según diferentes estudios realizados:

- a) como aceptores de electrones en la oxidación microbiana de una amplia gama de sustratos orgánicos, como acetato, lactato (Cervantes y col., 2000a), fenol, *p*-cresol (Cervantes y col., 2000b), y en la oxidación abiótica del sulfuro (Aranda-Tamaura y col., 2007),
- b) como donadores de electrones en la reducción microbiana de nitrato, nitrito, N_2O , fumarato, entre otros (Lovley y col., 1999; Aranda-Tamaura y col., 2007),
- c) como transportadores de electrones (mediadores redox) entre microorganismos reductores de Fe (III) y óxidos de Fe (III) insolubles (Lovley y Blunt-Harris, 1999), y durante biotransformaciones reductivas de colorantes azo, nitroaromáticos y solventes polihalogenados (Cervantes-Carrillo, 2002).

De manera general, las quinonas han aumentado la velocidad de conversión, tanto en procesos abióticos como procesos biológicos, de una amplia gama de contaminantes al participar como donador, aceptor o transportador de electrones en las reacciones involucradas (Field y Cervantes, 2005).

Un área en la que han sido últimamente utilizadas las quinonas, es en la eliminación de color de efluentes industriales, específicamente para la reducción de colorantes azo. Se ha encontrado que las velocidades de decoloración y las eficiencias de eliminación de color aumentan al estar presente las quinonas (Rau y col., 2002; dos Santos y col., 2005; Encinas-Yocupicio y col., 2006). Aun cuando los mediadores redox, en general, incrementaron las tasas de decoloración, sus efectos catalíticos difieren ampliamente entre los diferentes colorantes y mediadores redox explorados. De manera particular, Encinas-Yocupicio y col. (2006) observaron que entre más recalcitrante era el colorante, mas grande fue el impacto del mediador redox.

Rau y col. (2002) reportaron que el potencial redox de los transportadores de electrones juega un papel importante en la tasa de decoloración de los colorantes azo. Sin embargo, han sido observados diferentes efectos catalíticos con mediadores redox con valores de potenciales redox (E'_0) similares, difiriendo el impacto sobre el mismo colorante (Rau y col., 2002; dos Santos y col., 2005). Agregan que no sólo los valores de E'_0 pueden determinar las propiedades catalíticas de un mediador redox para estimular la decoloración reductiva de colorantes azo. También, la estructura del mediador redox, su concentración y la capacidad del consorcio anaerobio para reducirlo influyen en la capacidad catalítica de las quinonas.

Por otra parte, Encinas-Yocupicio y col. (2006) señalan en un estudio realizado con diferentes colorantes azo, que moderadas diferencias entre los valores de E° pueden tener consecuencias en la tasa de decoloración de colorantes azo, ya que observaron que 2 quinonas con intervalos similares de E° (AQDS y lawsona) mostraron diferencias importantes entre las tasas de decoloración lograda con los diferentes mediadores redox.

El humus también ha acelerado procesos biológicos para la degradación de contaminantes policlorados. Cervantes y col. (2004) observaron, al adicionar ácidos húmicos y AQDS a niveles sub-estequiométricos, un incremento de la tasa de conversión de tetracloruro de carbono hasta de 6 veces en comparación a las incubaciones con un lodo granular en las que estuvieron ausentes estas sustancias húmicas. Además, se logró un incremento del 40-50% en la producción de cloro inorgánico.

Respecto al papel de las quinonas como transportadores de electrones, se tiene muy poca información de su participación en un proceso desnitrificante. Aranda-Tamaura y col. (2007) utilizaron un proceso desnitrificante, en presencia de quinonas, para la oxidación de sulfuro, concluyendo que la participación de algunas quinonas en el proceso desnitrificante, aumentaron la velocidad de oxidación de sulfuro. Proponen además, un modelo de oxidación de sulfuro en un proceso desnitrificante en presencia de quinonas como mediadores redox (Fig 1.1).

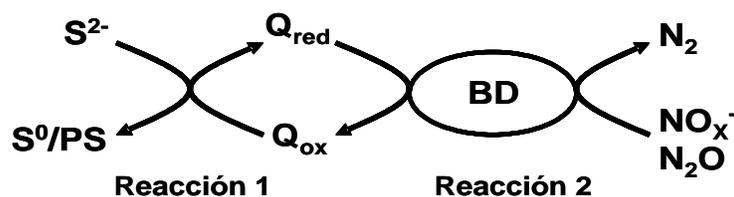


Figura 1.1. Mecanismo para la eliminación simultánea de sulfuro y compuestos nitrogenados bajo condiciones desnitrificantes mediadas por quinonas (Aranda-Tamaura y col., 2007).

Con base en lo anterior, es de interés evaluar y analizar el efecto de mediadores redox en un proceso organolitotrófico desnitrificante, dado que la información en la literatura es aún insuficiente en donde se estudie el efecto de las quinonas sobre la fisiología de la desnitrificación, donde además de encontrarse un compuesto recalcitrante como el *p*-cresol se encuentre presente una fuente inorgánica de electrones como el sulfuro.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación.

Aún cuando una actividad humana busque dar un servicio o beneficio a la sociedad, la mayoría de ellas generan residuos que originan impactos negativos al ambiente. Se requiere de compromiso por parte de los generadores de residuos para la búsqueda de minimización de los impactos ambientales. Entre los residuos más importantes se encuentran las aguas residuales, cuya importancia se ha intensificado debido a la escasez del recurso agua en la mayor parte del mundo, lo que ha llevado a buscar estrategias de tratamiento por la mayoría de las empresas e instituciones que las generan (Kemmer y McCallion, 1998).

Existen diversos efluentes de tipo industrial que contienen una amplia diversidad de compuestos entre los que se pueden encontrar los compuestos nitrogenados, azufrados y orgánicos, desde los de fácil oxidación hasta los conocidos como recalcitrantes. Este tipo de efluentes es más recurrente en las industrias, principalmente de los sectores químico y petroquímico. Es de suma importancia encontrar procesos de tratamiento en los que se pueda llevar a cabo la eliminación conjunta de estos compuestos. Se puede recomendar la desnitrificación para el tratamiento de estas aguas, ya que se ha observado la capacidad de los microorganismos desnitrificantes de acoplar la oxidación de compuestos orgánicos y azufrados con la reducción de NO_3^- a N_2 (Fang, 1999; Thomas y col., 2002; Puig-Grajales y col., 2003; Olmos y col., 2004; Reyes-Avila y col., 2004; Sierra-Alvarez y col., 2005; Cardoso y col., 2006; Sierra-Alvarez y col., 2007; Guerrero, 2007). Cabe señalar, que existen muy pocos trabajos en lo que se ha investigado la eliminación simultánea de los compuestos azufrados y compuestos fenólicos mediante un proceso desnitrificante. El estudio de la oxidación conjunta de ambas fuentes de energía (orgánica e inorgánica) está en una etapa temprana por lo que son necesarios estudios que aporten información fisiológica de un lodo desnitrificante en presencia de estos 2 tipos de fuentes de electrones. Es necesario identificar, por medio de estudios cinéticos, qué pasos son inhibidos del proceso de reducción de nitrato y la oxidación de *p*-cresol en presencia del sulfuro.

La oxidación de compuestos orgánicos recalcitrantes, como los compuestos fenólicos, en condiciones desnitrificantes heterotróficas, puede requerir de un largo tiempo para alcanzar la mineralización, por lo que es necesario buscar estrategias que permitan aumentar las tasas de oxidación de dichos compuestos. Una posible alternativa es utilizar quinonas, las

cuales han demostrado en diversos procesos, ejercer un efecto positivo en las velocidades de oxidación de diferentes contaminantes. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados en presencia de quinonas han sido con una sola fuente de energía, ya sea orgánica o inorgánica, pero es casi nula la información con ambas fuentes de energía en procesos desnitrificantes. Por lo tanto, es necesario estudiar el efecto de algunas quinonas en la oxidación simultánea de materia orgánica recalcitrante (*p*-cresol), de fuente inorgánica de energía (S^{2-}) y en la reducción de nitrato.

Con base en lo anterior, se han planteado las siguientes hipótesis:

- I El sulfuro ocasiona un efecto inhibitorio en las velocidades específicas respiratorias de un proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de electrones.
- II La presencia de quinonas aumentará la velocidad de oxidación de sulfuro y *p*-cresol en un proceso desnitrificante, mediante su participación como transportadores de electrones en la reducción de nitrato.

2.2 Objetivos.

2.2.1 Objetivos generales.

- 1) Evaluar y determinar el efecto del sulfuro sobre la desnitrificación organotrófica con *p*-cresol como fuente de electrones.
- 2) Cuantificar y analizar el efecto de diferentes quinonas en la fisiología de un proceso respiratorio desnitrificante, para la eliminación simultánea de nitrato, sulfuro y *p*-cresol.

2.2.2 Objetivos particulares.

- 1) Caracterizar en un reactor en continuo, un consorcio desnitrificante en condiciones organotróficas capaz de eliminar nitrato y *p*-cresol en estado estacionario.
- 2) Evaluar en cultivos en lote, la capacidad de un lodo desnitrificante de oxidar simultáneamente *p*-cresol y sulfuro por vía desnitrificante.
- 3) Evaluar en cultivos en lote, el efecto de diferentes concentraciones de sulfuro sobre el proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía.
- 4) Cuantificar y analizar en cultivos en lote, el efecto de las quinonas en las velocidades específicas de oxidación de *p*-cresol y sulfuro y en las velocidades de reducción de nitrato en un proceso desnitrificante organolitotrófico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactor continuo desnitrificante.

Se puso en marcha un reactor desnitrificante tipo lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) de 1.4 L. El influente se constituyó de 2 medios de cultivo (uno con la fuente de N y otro con la fuente de C) alimentados por separado para disminuir problemas de precipitación de las sales. El reactor contó con controlador de temperatura a 30°C y con un dispositivo para la recolección de biogás formado, el cual consistió de una columna de solución salina saturada (300 g NaCl/L).

El reactor se inoculó con lodo procedente de un reactor desnitrificante operado en régimen estacionario con acetato como fuente de carbono. Se midió la concentración de biomasa, expresada como sólidos suspendidos volátiles (SSV), y se inoculó el reactor con la cantidad necesaria para obtener una concentración final de 6 g SSV/L.

El reactor desnitrificante se alimentó a una relación C/N teórica de 1.2, utilizando *p*-cresol y acetato como fuentes de carbono. Cada medio se alimentó al reactor a través de bombas peristálticas, con un caudal de 0.35 L/d. El caudal total alimentado del reactor fue de 0.7 L/d, con lo que se estableció un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 2 d. La composición del medio de alimentación al reactor se presenta en las Tablas 3.1 y 3.2.

Tabla 3.1. Medio de cultivo del reactor desnitrificante.

FUENTE DE CARBONO		FUENTE DE NITRÓGENO	
CH ₃ COONa	0.305 g/L	NaNO ₃	1.716 g/L
<i>p</i> -cresol	0.319 g/L	NaSO ₄	2.0 g/L
KH ₂ PO ₄	1.5 g/L	2 mL/L de solución elementos traza *	
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.4 g/L	* composición detallada en Tabla 3.2	

Tabla 3.2. Composición de la solución de elementos traza.

Elementos traza (g/L)			
FeCl ₃ (6H ₂ O)	0.03	CuSO ₄ ·(5H ₂ O)	0.02
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.60	Na ₂ MoO ₄ (2H ₂ O)	0.12

Las velocidades de carga de carbono y nitrógeno obtenidas fueron 85.4 ± 1.2 mg C/L d y 75.5 ± 0.4 mg N-NO₃⁻/L d.

Para identificar si el reactor se encontraba en régimen estacionario, se realizaron mediciones de los compuestos carbonados (*p*-cresol y sus intermediarios aromáticos, acetato, HCO₃⁻) y nitrogenados (NO₃⁻, NO₂⁻, N₂O, N₂, NH₄⁺) en el influente y efluente del reactor para calcular las velocidades de carga y descarga de carbono y nitrógeno con el tiempo. Las variables de respuesta utilizadas para evaluar el proceso respiratorio fueron eficiencia de consumo de sustratos (E, g sustrato consumido/ g de sustrato inicial × 100), rendimientos de formación de productos (Y, g de sustrato producido/ g de sustrato consumido) y las velocidades específicas de consumo (mg C, N o S consumido/g SSV d) y producción (mg C, N o S producido/g SSV d).

Las velocidades específicas, tanto de consumo como de producción, fueron determinadas con la máxima pendiente observada en la regresión lineal considerando al menos 3 puntos. El coeficiente de determinación (R²) fue mayor que 0.9 para la mayoría de las velocidades específicas determinadas, sólo unas pocas velocidades mostraron valores de R² alrededor de 0.8.

3.2 Pruebas en lote.

3.2.1 Proceso desnitrificante en presencia de *p*-cresol y sulfuro.

3.2.1.1 Ensayos en lote organotróficos con *p*-cresol como fuente de energía.

Los cultivos en lote se realizaron en botellas de 160 mL con un volumen de trabajo de 60 mL y un espacio de cabeza de 100 mL. Se inocularon con biomasa proveniente del reactor continuo en régimen estacionario alimentado con acetato y *p*-cresol como fuente de energía, obteniendo una concentración final en las botellas de 1 g SSV/L. Primeramente, se realizaron los controles experimentales. Los controles en presencia de biomasa activa fueron: uno sin fuente de carbono y energía, otro sin aceptor de electrones y, en lo que respecta a los controles abióticos, es decir en ausencia de biomasa, se realizó un cultivo con los tres compuestos (nitrato, *p*-cresol y sulfuro). Se realizaron cultivos en presencia de biomasa con *p*-cresol y nitrato en concentraciones estequiométricas (44 mg C-*p*-cresol/L y 50 mg N-NO₃⁻/L) para una relación C/N de 0.88.

El medio basal utilizado consistió de (g/L): KH_2PO_4 (0.6), K_2HPO_4 (1.6), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2) y 2 mL/L de la solución de elementos traza (Tabla 3.2). La fase gaseosa de las botellas fue saturada con helio. Las botellas fueron selladas con tapones de hule y sellos de aluminio para mantener condiciones anaerobias.

Todos los tratamientos experimentales se llevaron a cabo por duplicado y fueron incubados a 30 °C y 200 rpm por un período de 48 horas. Cada botella fue una unidad experimental independiente, la cual fue sacrificada después de tomar muestras. En todos los casos, se realizaron cinéticas de consumo de sustratos y de formación de productos, tomando muestras líquidas y gaseosas a diferentes tiempos de incubación. Las muestras líquidas fueron filtradas con una membrana de 0.45 μm antes de su análisis. Los parámetros analizados en los cultivos controles fueron: Carbono total (CT), carbono inorgánico (CI), carbono orgánico total (COT), nitrato, nitrito y N_2 . Además de estos compuestos, en los cultivos organotróficos en presencia de *p*-cresol y nitrato, se determinaron *p*-cresol, HCO_3^- , *p*-hidroxibenzoato.

Para este ensayo, durante el periodo en el que tanto nitrato como nitrito estuvieron presentes (durante las primeras 5 horas de incubación), $q_{\text{NO}_2^-}$ fue determinada con la siguiente ecuación:

$$q_{\text{NO}_2^-} = q_{\text{NO}_3^-} - q_{\text{NO}_2^- \text{ out}}$$

donde, $q_{\text{NO}_3^-}$ es la tasa de consumo de nitrato y $q_{\text{NO}_2^- \text{ out}}$ es la tasa de producción de nitrito.

3.2.1.2 Ensayos en lote organolitotróficos con *p*-cresol y 20 ppm de S^{2-} como fuente alterna de energía.

Los estudios con sulfuro como fuente de energía alterna, se mantuvieron con la relación estequiométrica entre la fuente oxidante y reductora por lo que se trabajaron con las siguientes concentraciones: 20 mg S^{2-} /L, 44 mg *C-p*-cresol/L, y 65 mg N-NO_3^- /L. El sulfuro fue agregado de una solución madre de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. El medio basal y las condiciones de operación fueron iguales a los ensayos desarrollados en condiciones organotróficas. Los parámetros determinados en estos cultivos en lote fueron los mismos que los determinados en los cultivos organotróficos, añadiendo solamente los correspondientes a los compuestos azufrados como fueron el sulfuro, sulfato y tiosulfato.

3.2.1.3 Ensayos en lote organolitotróficos con *p*-cresol y diferentes concentraciones de sulfuro como fuente de energía.

Por otra parte, para evaluar el efecto del aumento en la concentración de sulfuro sobre el proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía, se realizaron cultivos en lote con la misma concentración de *p*-cresol utilizada en los experimentos anteriores (44.12 mg C-*p*-cresol/L) y 3 concentraciones de sulfuro (25, 50 y 100 mg S²⁻/L). Para conservar las condiciones experimentales anteriores, se continuó trabajando con las concentraciones estequiométricas para la fuente oxidante y la fuente reductora del proceso, por lo que se fue incrementando la concentración de nitrato necesaria para oxidar tanto al *p*-cresol como al sulfuro. Las concentraciones utilizadas fueron: 64, 85 y 120 mg N-NO₃⁻/L. En el caso del cultivo control (en ausencia de sulfuro) se utilizaron las concentraciones mencionadas en los cultivos organotróficos anteriores (44 mg C/L y 50 mg N-NO₃⁻/L).

La biomasa con la que se inocularon las botellas para estos experimentos estuvo en contacto con diferentes concentraciones de sulfuro en experimentos anteriores. Esta biomasa se retornó al reactor después de haberla lavado con una solución salina al 0.9% y se estabilizó bajo las condiciones organotróficas descritas en la sección 3.1 por un periodo aproximado de un mes y medio sin tener entradas o salidas de biomasa del reactor. De la misma manera que en los otros cultivos en lote, la concentración inoculada a las botellas fue de 1 g SSV/L. Los parámetros que se determinaron en estos experimentos para evaluar el efecto del sulfuro sobre el proceso organotrófico fueron: CT, CI, COT, *p*-cresol, HCO₃⁻, nitrato, nitrito, N₂, sulfuro y sulfato.

3.2.2 Efecto de mediadores redox en el proceso desnitrificante organolitotrófico.

3.2.2.1 Cultivos en lote, organotróficos y organolitotróficos, en presencia de diferentes mediadores redox.

La evaluación de los mediadores redox sobre el proceso desnitrificante, tanto organotrófico como organolitotrófico, se hizo empleando 3 quinonas:

	E°
a) 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lawsona)	-140 mV
b) Antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS)	-184 mV
c) 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS)	220 mV

Las condiciones de operación fueron las mismas utilizadas en los cultivos en ausencia de la quinonas descritas en los apartados 3.2.1.1 y 3.2.1.2 y condiciones estequiométricas. La concentración de quinona utilizada en los experimentos fue de 50 μM en todos los casos. Estas quinonas fueron seleccionadas considerando los resultados obtenidos por Aranda-Tamaura y col., 2007.

Además, se realizaron cultivos controles bióticos y abióticos. Dentro de los controles abióticos (en ausencia de biomasa) se realizaron los siguientes: cada fuente de electrones (*p*-cresol y sulfuro) por separado en ausencia del aceptor y el aceptor de electrones (nitrato) en ausencia de fuente de electrones, en presencia de la quinona, esto, para determinar si ocurría alguna reacción química entre los sustratos y las quinonas a la concentración utilizada de las mismas (50 μM) y diferenciarlo de la reacción biológica en presencia de la biomasa. Con respecto a los controles bióticos sólo se realizó el cultivo con sulfuro sin aceptor de electrones en presencia de la quinona. Para poder identificar y evaluar el efecto de la quinona sobre el proceso organolitotrófico y diferenciarlo del efecto del sulfuro sobre el proceso, se realizó primeramente el cultivo en lote organotrófico con nitrato y *p*-cresol en ausencia sulfuro con la respectiva quinona y posteriormente los cultivos organolitotróficos en presencia de las quinonas. Estos experimentos se realizaron con biomasa procedente del reactor desnitrificante alimentado con acetato y *p*-cresol sin haber estado expuesto a sulfuro y una vez utilizada para los cultivos en lote en presencia de quinonas, ésta no fue retornada al reactor, ni considerada para experimentos posteriores. Los parámetros determinados para evaluar el efecto de los 3 mediadores redox fueron: Carbono total, carbono inorgánico, carbono orgánico total, nitrato, nitrito, N_2 , *p*-cresol, HCO_3^- , *p*-hidroxibenzoato, sulfuro y sulfato.

3.2.2.2 Cultivos en lote organolitotróficos con diferentes concentraciones de sulfuro en presencia de NQS.

Se realizaron cultivos en lote con las mismas concentraciones de sulfuro y condiciones de trabajo utilizadas en experimentos realizados en ausencia de quinonas (descrito en la sección 3.2.1.3). La quinona aplicada en esta parte experimental fue la NQS, debido a resultados obtenidos en ensayos previos donde se observó que esta quinona ejercía efectos positivos sobre el proceso desnitrificante organolitotrófico. Además, Aranda-Tamaura y col. (2007) obtuvieron efectos positivos de esta quinona en un proceso desnitrificante litotrófico

con sulfuro, como única fuente de energía a concentraciones estequiométricas. Los parámetros medidos en estos cultivos fueron: CT, CI, COT, NO_3^- , NO_2^- , N_2 , *p*-cresol, HCO_3^- , *p*-hidroxibenzoato, sulfuro y sulfato.

3.3 Métodos de análisis.

Los fundamentos de los métodos y técnicas de análisis utilizadas, así como las curvas estándares que muestran la reproducibilidad de los métodos de medición, de los compuestos carbonados, nitrogenados y azufrados, se muestran en el Anexo 1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estabilización de un reactor desnitrificante alimentado con *p*-cresol y acetato como fuentes de carbono y energía.

Para obtener la biomasa requerida en los experimentos del presente estudio, se operó un reactor desnitrificante, bajo condiciones organotróficas, hasta lograr el estado estacionario. El reactor desnitrificante se alimentó con una relación C/N mayor que la estequiométrica, utilizando *p*-cresol y acetato como fuentes de carbono. El *p*-cresol fue adicionado para ajustar la relación C/N al valor estequiométrico, la cual es de 0.88; mientras que el excedente fue agregado en forma de acetato (23.5% del carbono total) para obtener la relación C/N final de 1.13. Lo anterior, fue establecido para ver la posibilidad de inducir un mayor crecimiento microbiano en el consorcio en estudio, sin dejar que sea esencialmente desasimilativo. Peña-Calva y col. (2004) sugirieron que valores de C/N cercanos al estequiométrico propician que el proceso respiratorio predomine sobre al anabólico.

La velocidad de carga de carbono tuvo un valor promedio de 85.4 ± 1.2 mg Carbón orgánico total (COT)/L d. Se logró una eficiencia de consumo de *p*-cresol ($E_{p\text{-cres}}$) y de acetato (E_{Ac}) del 100 % y un rendimiento en la producción de bicarbonato ($Y_{HCO_3^-}$) de 0.73 ± 0.04 . Con respecto a los compuestos nitrogenados, la velocidad de carga de nitrato tuvo un valor promedio de 75.5 ± 0.44 mg N- NO_3^- /L d. Las velocidades de descarga de nitrato y nitrito no fueron significativas, pues presentaron valores menores que el 2% del nitrógeno de entrada, por lo que se obtuvo una eficiencia de consumo de nitrato ($E_{NO_3^-}$) de 99.5 ± 0.2 %. Se observó una alta velocidad de producción de nitrógeno molecular y lográndose un rendimiento de producción de N_2 promedio (Y_{N_2}) de 0.88 ± 0.04 . De acuerdo con los datos de velocidad del proceso desnitrificante se alcanzó el régimen estacionario, ya que las velocidades volumétricas de todos los parámetros, tanto carbonados como nitrogenados, se mantuvieron constantes durante el periodo de evaluación del proceso (Tabla 4.1).

Cabe señalar que el COT en el efluente estaba constituido por compuestos orgánicos no identificados, ya que no se detectaron en el efluente del reactor a los intermediarios aromáticos de la ruta de oxidación anaerobia del *p*-cresol propuesta en la literatura, como son *p*-hidroxibencilalcohol, *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzoato (Häggbloom y col.,

1990; Heider y Fuchs 1997; Strand 2000). La formación de amonio vía reducción desasimilativa de nitrato (RDNA) no fue detectada en el reactor desnitrificante.

Tabla 4.1. Balance de compuestos carbonados y nitrogenados en el reactor UASB desnitrificante alimentado con acetato y *p*-cresol.

Parámetro	Velocidad (mg/Ld)
COT_{inf}	85.4 ± 1.2
CIT^a_{efl}	56.7 ± 3.7
COT_{efl}	7.2 ± 0.8
C-biomasa^b	12.6 ± 1.9
N- NO₃⁻_{inf}	75.5 ± 0.44
N- NO₃⁻_{efl}	0.4 ± 0.1
N- NO₂⁻_{efl}	1.0 ± 0.3
N₂	65.8 ± 3.1
N-biomasa	2.5 ± 0.4

^aCIT: Es el resultado de la suma del carbono inorgánico total (CIT) disuelto y el C-CO₂ medido en el espacio de cabeza del reactor.

^bC-biomasa fue determinado mediante la medición de los SSV (ver Anexo 1)

inf: influente; efl: efluente.

4.2 Cultivos en lote.

4.2.1 Efecto del sulfuro en un proceso desnitrificante organotrófico con *p*-cresol como fuente de energía.

Los experimentos en lote fueron llevados a cabo con concentraciones estequiométricas entre la fuente oxidante y la fuente reductora, incluyendo 44 mg C-*p*-cresol/L y 50 mg N-NO₃⁻/L en los cultivos organotróficos. En los cultivos organolitotróficos se incluyeron 44 mg C-*p*-cresol/L, 65 mg N-NO₃⁻/L y 20 mg S²⁻/L. El objetivo de este trabajo fue identificar el papel del sulfuro sobre un proceso desnitrificante organotrófico con *p*-cresol como fuente de electrones.

Los perfiles de consumo de los compuestos carbonados y azufrados (en el caso del cultivo organolitotrófico), se presentan en la Figura 4.1.

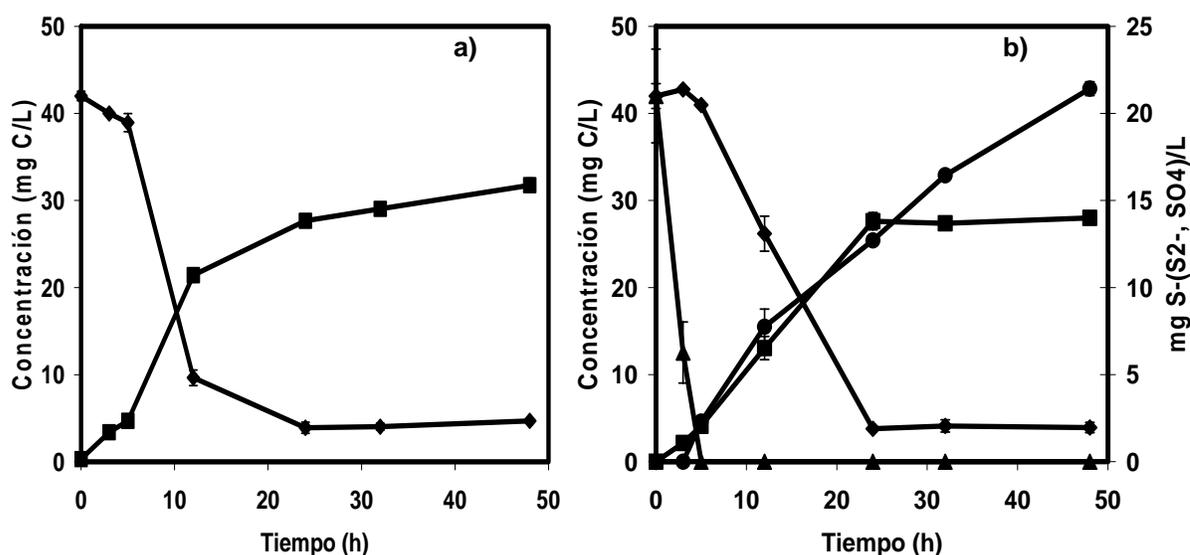


Figura 4.1. Perfiles de los compuestos carbonados y azufrados durante la oxidación de *p*-cresol: a) en ausencia de sulfuro y b) en presencia de sulfuro, en condiciones desnitrificantes. COT (◆); CIT (■); S²⁻ (▲); S-SO₄²⁻ (●). Los datos graficados son el resultado de experimentos realizados por duplicado, las barras de error indican la desviación estándar.

El consorcio evaluado desarrolló un alto grado de mineralización de *p*-cresol, el cual fue completamente consumido durante las primeras 12 horas de incubación en ausencia de sulfuro, lográndose un $Y_{\text{HCO}_3^-}$ de 0.77 ± 0.02 . El tiempo requerido para el consumo del *p*-cresol aumentó al estar presente el sulfuro, como puede observarse en la Figura 4.1b. El $Y_{\text{HCO}_3^-}$ no fue significativamente afectado por el sulfuro (9% menor comparado con el control en ausencia de sulfuro). También, se puede observar en la Figura 4.1b que se llevó a cabo la

oxidación del sulfuro en las primeras 5 horas del cultivo y que éste se oxidó completamente a sulfato.

La reducción del nitrato en ambos cultivos (organotrófico y organolitotrófico) se presentan en la Figura 4.2. El tiempo requerido para el consumo de nitrato aumentó en presencia del sulfuro, lo mismo que la acumulación de NO_2^- . La eficiencia de consumo de nitrato ($E_{\text{NO}_3^-}$) en ambos casos fue del 100% y el rendimiento de producción de N_2 menor que 1 ($Y_{\text{N}_2}=0.66 \pm 0.01$) después de 48 horas de incubación. De la misma manera que con los compuestos carbonados, el sulfuro no tuvo un efecto negativo significativo sobre el rendimiento de formación de N_2 (Y_{N_2}) debido a que sólo disminuyó un 6%.

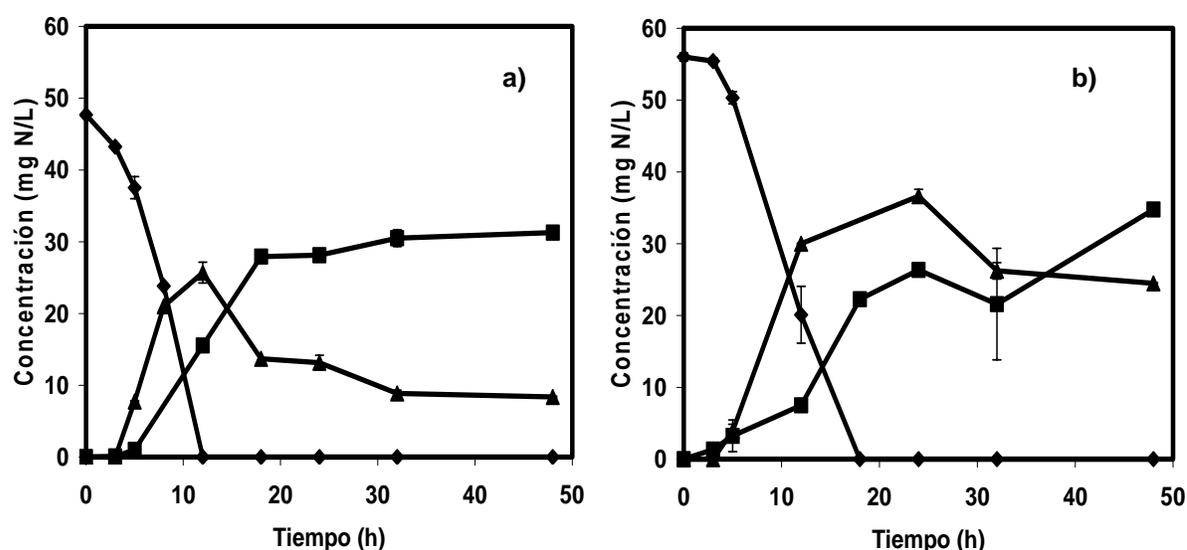


Figura 4.2. Actividades desnitrificantes obtenidas con *p*-cresol como fuente de electrones: a) en ausencia de sulfuro y b) en presencia de sulfuro. N-NO_3^- (♦), N-NO_2^- (▲), N_2 (■). Los datos graficados son el resultado de experimentos realizados por duplicado, las barras de error indican la desviación estándar.

Con respecto a las velocidades de consumo de sustrato y formación de producto, éstas se presentan en la Tabla 4.2. Para evaluar el efecto del sulfuro sobre el proceso desnitrificante, las velocidades específicas fueron determinadas para dos periodos de tiempo durante los cultivos. El primer periodo considerado, comprendió las primeras 5 horas de incubación, periodo durante el cual, en los cultivos organolitotróficos, estuvo presente el sulfuro. El segundo periodo considerado para la determinación de las velocidades, para ambos procesos, fue después de las 5 horas de incubación. Estos valores de velocidades están reportados entre paréntesis e indican las velocidades obtenidas después de que se completó el consumo de sulfuro en el cultivo organolitotrófico. La $q_{\text{NO}_2^-}$ fue determinada con la

ecuación señalada en la sección 3.2.1.1 de materiales y métodos, durante las primeras 5 horas de incubación. Los valores de $q_{\text{NO}_2^-}$ entre paréntesis representan las velocidades de reducción de nitrito, las cuales fueron obtenidos para el periodo de incubación en el que se presenta la reducción del mismo y durante el cual ya había sido consumido completamente el nitrato.

La adición de sulfuro afectó negativamente las velocidades específicas de la mayoría de los pasos involucrados en la desnitrificación. Además, es importante mencionar que la desnitrificación organotrófica fue significativa sólo después de que el sulfuro fue consumido completamente (Figura 4.1b). La velocidad específica de oxidación del COT (q_{COT}) disminuyó un 72%, comparado con el control en ausencia de sulfuro, durante el tiempo que el sulfuro estuvo presente, pero se recuperó completamente después que el sulfuro fue consumido. La velocidad específica de formación de bicarbonato ($q_{\text{HCO}_3^-}$) disminuyó un 14% y un 48%, comparado con los cultivos realizados sin sulfuro, en los periodos en los cuales el sulfuro estuvo presente y totalmente consumido, respectivamente. El mayor consumo de COT estuvo asociado con la reducción de nitrato a nitrito, mientras que ocurrió un consumo considerablemente menor cuando el nitrito fue la única fuente de electrones disponible (Figuras 4.1 y 4.2).

Tabla 4.2. Velocidades específicas respiratorias (mg N o mg C/g SSV.d) utilizando *p*-cresol como fuente de electrones en ausencia y presencia de sulfuro.

Condiciones	$q_{\text{NO}_3^-}$	$q_{\text{NO}_2^-}$	q_{N_2}	q_{COT}^*	$q_{\text{HCO}_3^-}$
Nitrato + <i>p</i> -cresol	47.6 ± 6 (129 ± 5.6)	35.4 ± 0.4 (21 ± 1.0)	5.9 ± 1.6 (50 ± 1.0)	32.7 ± 2.0 (40.7 ± 0.5)	22.9 ± 0.6 (57.4 ± 2.3)
Nitrato + <i>p</i> -cresol + sulfuro	26 ± 6.0 (93 ± 2.0)	21.6 ± 5.6 (11 ± 1.0)	8.4 ± 0.9 (32 ± 2.4)	9.3 ± 1.0 (46.7 ± 0.8)	19.7 ± 2.3 (29.6 ± 2.1)

*Las q_{COT} en términos de *p*-cresol ($q_{p\text{-cres}}$) son: 28.6 ± 0.8, (118 ± 2.0) en condiciones organotróficas y 19.1 ± 1.7, (66.5 ± 0.9) en condiciones organolitotróficas. Las velocidades específicas son el valor promedio de experimentos por duplicado ± desviación estándar.

La velocidad específica de oxidación del sulfuro fue 5.4 veces mayor a la velocidad de oxidación del compuesto carbonado (q_{COT}), en términos de equivalentes de electrones, durante la eliminación simultánea de sulfuro y *p*-cresol. Los resultados revelan la preferencia del consorcio estudiado para oxidar el sulfuro, sobre el *p*-cresol, como fuente de energía, aun

cuando la biomasa estuvo previamente estabilizada bajo condiciones organotróficas (Tabla 4.1). Reportes previos concuerdan con nuestros resultados, como en los trabajos de Reyes-Avila y col. (2004), quienes observaron que la velocidad de oxidación del sulfuro fue aproximadamente 10 veces mayor (en términos de equivalentes de electrones) que la velocidad de oxidación del compuesto carbonado, cuando trabajaron en un proceso organolitotrófico con sulfuro y acetato como fuentes de energía, aunque en su caso, la biomasa fue previamente estabilizada con ambos donadores de electrones.

La baja q_{COT} observada en la presencia de sulfuro también se reflejó negativamente en un menor grado de mineralización del *p*-cresol en el presente estudio. La competencia entre los procesos litotróficos y organotróficos, por el nitrato disponible, podría ser descartada como el mecanismo inhibitorio en el consorcio evaluado, ya que se administró la concentración estequiométrica de nitrato para oxidar ambas fuentes de electrones (*p*-cresol y sulfuro). Esta observación es también apoyada por el incremento drástico ocurrido en la q_{COT} después que el sulfuro fue consumido completamente, lo que sugiere un efecto inhibitorio del sulfuro en la desnitrificación organotrófica (Tabla 4.2, Figura 4.1b).

La velocidad específica de reducción de nitrato ($q_{\text{NO}_3^-}$) disminuyó un 45%, comparado con los resultados obtenidos en ausencia de sulfuro, mientras éste estuvo presente en el cultivo (primeras 5 h de incubación, Figura 4.2b). Además, la velocidad de formación de N_2 (q_{N_2}) disminuyó un 36% en los cultivos adicionados con sulfuro, comparada con la velocidad obtenida en los controles sin sulfuro (Tabla 4.2).

La $q_{\text{NO}_3^-}$ permaneció 28% más baja en los cultivos en presencia de sulfuro, comparado con los cultivos sin sulfuro, aun después de que el sulfuro había sido completamente consumido. Reyes-Avila y col. (2004) también observaron una disminución del 42% en la $q_{\text{NO}_3^-}$ debido a la presencia de sulfuro en un cultivo desnitrificante organolitotrófico alimentado con sulfuro y acetato. Cardoso y col. (2006) también observaron una disminución en la velocidad de reducción de nitrato, de aproximadamente de 21 veces, cuando la concentración de sulfuro aumentó de 80 a 320 mg S^2/L . Otros estudios, en contraste, no reportan efectos en la velocidad de reducción de nitrato aun a concentraciones de sulfuro mayores a las utilizadas en este trabajo; es decir, 100 mg S^2/L y 588 mg S^2/L en cultivos en lote (Tugtas y Pavlostathis 2007) y reactores en continuo (Reyes-Avila y col., 2004).

La reducción del nitrito fue el paso más afectado por el sulfuro, ya que la $q_{\text{NO}_2^-}$ disminuyó 48%, comparado con el cultivo sin sulfuro, lo cual concuerda con otros estudios preliminares que reportan también acumulación de nitrito en cultivos expuestos a diferentes

concentraciones de sulfuro (Trouve y col., 1998; Reyes-Avila y col., 2004; Cardoso y col., 2006). Sin embargo, Tugtas y Pavlostathis (2007) sugieren que consorcios desnitrificantes que han sido expuestos previamente a sulfuro presenta una acumulación menor de nitrito, debido a la RDNA, comparado con un consorcio no expuesto a sulfuro.

Otro parámetro que parece estar en juego en la acumulación de NO_2^- en el presente estudio, independientemente de la presencia o ausencia de sulfuro, es la concentración de NO_3^- disponible. Definitivamente, la más alta $q_{\text{NO}_2^-}$ fue obtenida después de que el nitrato fue consumido completamente. Este escenario fue también observado por Schönharting y col. (1998) en un proceso desnitrificante con H_2S . Los autores atribuyen la acumulación de NO_2^- a aspectos cinéticos, es decir, que la reducción de nitrato procede más rápido que la reducción de nitrito. De lo anterior, se sugiere que un efecto sinérgico de NO_3^- y sulfuro podría explicar la acumulación de NO_2^- en el presente trabajo, lo cual es corroborado por la acumulación de NO_2^- en los cultivos en ausencia de sulfuro, mientras está presente el nitrato (Figura 4.2).

Es posible que la precipitación de metales, como Fe y Cu, los cuales son componentes esenciales de algunas enzimas del proceso desnitrificante, haya resultado de la adición de sulfuro en el medio. La acumulación de NO_2^- sugiere un efecto del sulfuro sobre la enzima nitrito reductasa, posiblemente debido a una precipitación de metales como Cu y Fe, los cuales son centros metálicos del sitio activo de esta enzima. Esta observación fue confirmada por medio de un programa de especiación (MINTEQ) utilizado para identificar compuestos precipitados en nuestros ensayos. La mayoría de las especies de fierro aparecen precipitadas aun en los ensayos en ausencia de sulfuro, pero respecto a las especies de Cu, hubo una diferencia significativa, las cuales permanecen más solubles en ausencia de sulfuro. Manconi y col. (2006) observaron un incremento en la acumulación de nitrito en un reactor en continuo después de haber ocurrido una precipitación de sales de hierro y cobre en el influente del reactor. Cervantes y col. (1998) encontraron también, en un proceso desnitrificante, la acumulación de NO_2^- y N_2O causada por deficiencias de cobre. Con base en lo anterior, se sugiere que la precipitación de metales traza, esenciales para las enzimas que participan en el proceso desnitrificante, puede ser una de las causas de la disminución en el rendimiento desnitrificante originado por el sulfuro. Lo anterior, también podría explicar por qué la velocidad de reducción de nitrito permanece baja en los cultivos en presencia de sulfuro, comparado a los controles en ausencia de sulfuro, aun cuando éste ya había sido oxidado totalmente.

Nuestros resultados difieren de otros estudios, los cuales han reportado la liberación de intermediarios gaseosos del proceso desnitrificante (N_2O y NO) debido a los efectos inhibitorios del sulfuro sobre este proceso. Por ejemplo, Sørensen y col. (1980) sugieren que el sulfuro fue responsable de una inhibición parcial de la reducción de NO . Park y col. (2002) observaron acumulación de N_2O , lo cual se evidenció al aumentar la concentración de NO_3^- en presencia de sulfuro. Igualmente, Sørensen y col. (1980) reportaron una fuerte inhibición ocasionada por la presencia de sulfuro en la reducción de N_2O , con la consecuente acumulación del mismo, al trabajar en condiciones de litotrofia. Resultados similares también fueron observados por Visser (1995). Estos intermediarios no fueron detectados en nuestros experimentos, ni en ausencia ni en presencia de sulfuro, probablemente debido a que el consorcio utilizado desarrolló altas tasas de reducción de N_2O y NO .

Como se mencionó anteriormente, se obtuvo la oxidación completa del sulfuro a SO_4^{2-} en el tiempo de incubación, aun cuando la desnitrificación fue incompleta, con la consecuente acumulación de intermediarios nitrogenados (Figura 4.2b). La oxidación completa del sulfuro a sulfato también ha sido observada en varios trabajos a valores de N/S estequiométricos (Vaiopoulou y col., 2005; Sierra-Alvarez y col., 2005; Manconi y col., 2006; Cardoso y col., 2006) y a valores de N/S mayores a los estequiométricos (Trouve y col., 1998; Cardoso y col., 2006), ya sea con sulfuro o tiosulfato como fuente de electrones.

Con respecto a los compuestos azufrados, pudo verse una velocidad de producción de SO_4^{2-} menor a la velocidad de consumo del sulfuro. En efecto, la velocidad de formación de sulfato obtenida en este estudio, fue menor que la de consumo de sulfuro (19 mg S- SO_4^{2-} g/SSV d vs 82 mg S^2/g SSV d). Resultados similares fueron obtenidos por Reyes-Avila y col. (2004) quienes encontraron que la oxidación de sulfuro procedió en dos pasos y que el primero (oxidación de sulfuro a azufre) fue más rápido que el segundo (formación de sulfato a partir del S^0). Se asume que el intermediario azufrado, que se presentó en los cultivos del presente trabajo, fue azufre elemental, el cual no fue cuantificado. Sin embargo, la observación anterior es apoyada por la ausencia de tiosulfato, el cual es otro intermediario de la oxidación del sulfuro a sulfato (Visser, 1995; Janssen, 1996; Trouve y col., 1998; Reyes-Avila y col., 2004; Sierra-Alvarez y col., 2005; Cardoso y col., 2006), en los cultivos realizados.

Es importante enfatizar que aun con los efectos inhibitorios del sulfuro, observados sobre el proceso desnitrificante, se puede llevar a cabo la eliminación simultánea de *p*-cresol, sulfuro y nitrato, con eficiencias de consumo de estos sustratos del 100% y con un alto grado de mineralización de la materia orgánica durante el periodo de incubación (48 h). Sin embargo,

una importante fracción de N-NO_3^- terminó en forma de N-NO_2^- (18% en ausencia de sulfuro y 43% en los cultivos en los que se adicionó el sulfuro).

Nuestros resultados concuerdan con estudios preliminares (Sierra-Alvarez y col., 2005) que revelan la aplicación exitosa de reactores UASB para la eliminación simultánea de sulfuro, nitrato y *p*-cresol en aguas residuales. Estos reactores son caracterizados por un alto contenido de biomasa (30-50 g SSV/L), según Lettinga y col. (1980), lo que permite altas tasas de conversión de diferentes contaminantes. El largo periodo de incubación requerido para completar la conversión de todos los contaminantes sugiere que el TRH es un parámetro clave a considerar en los reactores UASB, para tratar efluentes industriales que contengan altas concentraciones de sulfuro, nitrógeno y compuestos fenólicos, tales como las generadas en las refinerías petroquímicas.

4.2.2 Efecto de diferentes concentraciones de sulfuro sobre el proceso desnitrificante organotrófico, con *p*-cresol como fuente reductora.

El objetivo de estos experimentos fue obtener información más detallada sobre el efecto del sulfuro sobre la actividad desnitrificante organotrófica en presencia de *p*-cresol. Se asume que al aumentar la concentración de sulfuro en los cultivos, habrá un efecto inhibitorio mayor sobre las velocidades específicas respiratorias, así como en los rendimientos (ruta respiratoria) del proceso desnitrificante.

Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sulfuro (25, 50 y 100 ppm S^{2-}) sobre el proceso desnitrificante, se realizó, primeramente, el cultivo en condiciones organotróficas en ausencia de sulfuro. Se detectó la acumulación de intermediarios carbonados de la ruta de oxidación del *p*-cresol, hasta el final del periodo de incubación, así como la acumulación permanente de NO_2^- en el proceso desnitrificante. También se presentó una acumulación de N_2O , el cual no había sido identificado en los experimentos previos. La eficiencia de consumo de los sustratos fue del 100%, mientras que el $Y_{\text{HCO}_3^-}$ fue de 0.74 ± 0.04 . Respecto al rendimiento de los compuestos nitrogenados, el Y_{N_2} fue 0.48 ± 0.002 , debido a la acumulación de NO_2^- y N_2O .

Cabe señalar, que el tiempo requerido para el consumo de ambos sustratos (*p*-cresol y NO_3^-) disminuyó, de 12 a 4 horas, en comparación con los cultivos organotróficos realizados anteriormente (sección 4.2.1).

Para evaluar el comportamiento del lodo desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro, se mantuvo constante la concentración de *p*-cresol, variando la concentración de nitrato (64, 85 y 120 mg N-NO₃⁻/L) y de sulfuro (25, 50 y 100 mg S²⁻/L) de forma paralela, para balancear estequiométricamente la concentración de nitrato, con respecto al sulfuro y *p*-cresol.

Al aumentar la concentración de sulfuro a 50 y 100 ppm de S²⁻, el tiempo requerido para oxidar el *p*-cresol aumentó con respecto al control sin sulfuro (Figura 4.3). En todas las concentraciones de sulfuro probadas, la eficiencia del consumo de *p*-cresol ($E_{p\text{-cres}}$) fue del 100%.

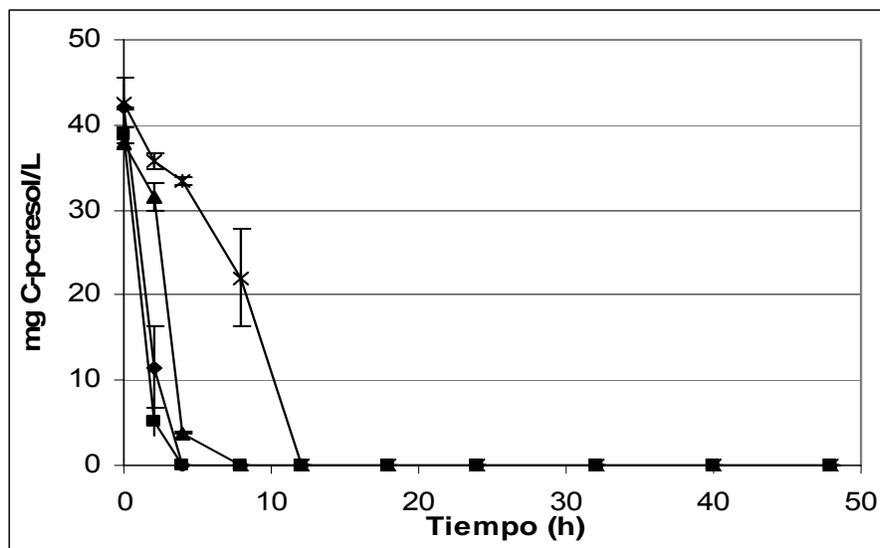


Figura 4.3. Perfiles de consumo de *p*-cresol en un proceso desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro. 0 ppm S²⁻ (◆), 25 ppm S²⁻ (■), 50 ppm S²⁻ (▲), 100 ppm S²⁻ (×)

Debido a la acumulación de intermediarios carbonados, se observó una disminución en el grado de mineralización del *p*-cresol, a todas las concentraciones de sulfuro evaluadas, resultando valores de $Y_{\text{HCO}_3^-}$ menores que 1 (Tabla 4.3). Los perfiles indican que el proceso de oxidación de *p*-cresol se estabiliza, una vez que éste se consume al 100%, quedando el carbono restante en forma de posibles intermediarios de la ruta de oxidación del *p*-cresol no identificados (Figura 4.4b). Se realizaron análisis para determinar intermediarios aromáticos de la ruta de oxidación anaerobia del *p*-cresol, de los descritos en la literatura, sin lograr identificarlos (Häggblom y col., 1990; Heider y Fuchs 1997; Strand 2000).

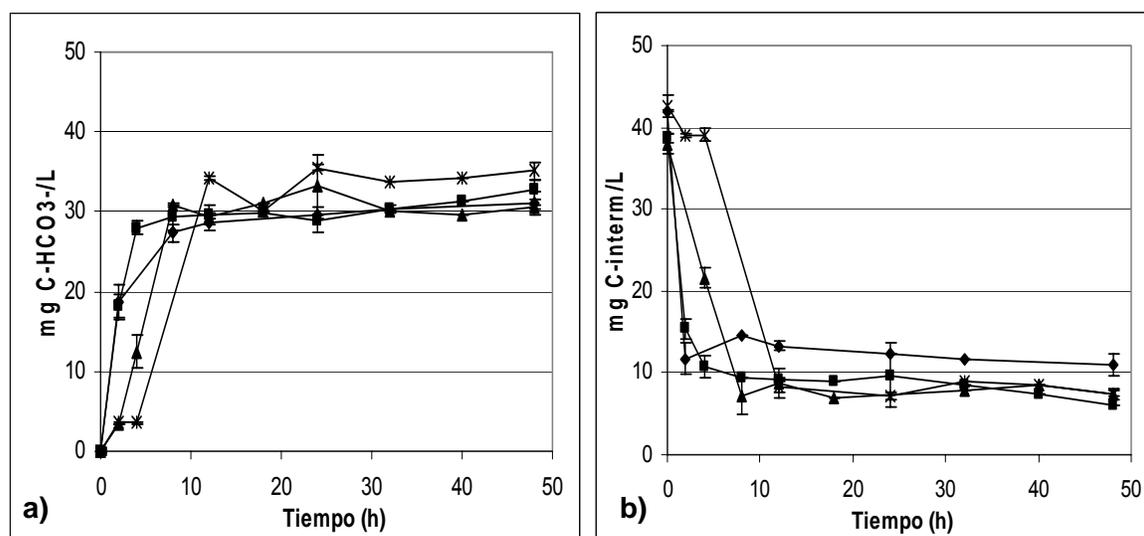


Figura 4.4. Perfiles de formación de los productos de la oxidación del *p*-cresol: a) C-HCO₃⁻ y b) C-Intermediarios, en un proceso desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro. 0 ppm S²⁻ (♦), 25 ppm S²⁻ (■), 50 ppm S²⁻ (▲), 100 ppm S²⁻ (×)

Tabla 4.3. Rendimientos de formación de productos del proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro.

S ²⁻ (mg/L)	*Y _{HCO₃⁻}	Y _{N₂}	Y _{SO₄⁼}
0	0.74 ± 0.04	0.48 ± 0.002	--
25	0.84 ± 0.04	0.38 ± 0.001	1.07 ± 0.001
50	0.8 ± 0.007	0.67 ± 0.040	0.91 ± 0.02
100	0.83 ± 0.03	0.41 ± 0.004	0.085 ± 0.01

*Los rendimientos de formación de producto fueron determinados a las 48 h.

De manera similar a lo ocurrido con la oxidación del *p*-cresol, el tiempo necesario para el consumo del nitrato no fue afectado por la concentración de 25 ppm de sulfuro, de manera similar a lo observado en el control en ausencia de sulfuro (Figura 4.5). Prácticamente, se obtuvo el consumo completo de nitrato en todos los tratamientos experimentales, obteniéndose eficiencias de consumo (E_{NO₃⁻}) del 100%, excepto en los cultivos en presencia de 100 ppm S²⁻, en el que se obtuvo una E_{NO₃⁻} de 96.12 ± 0.0001%.

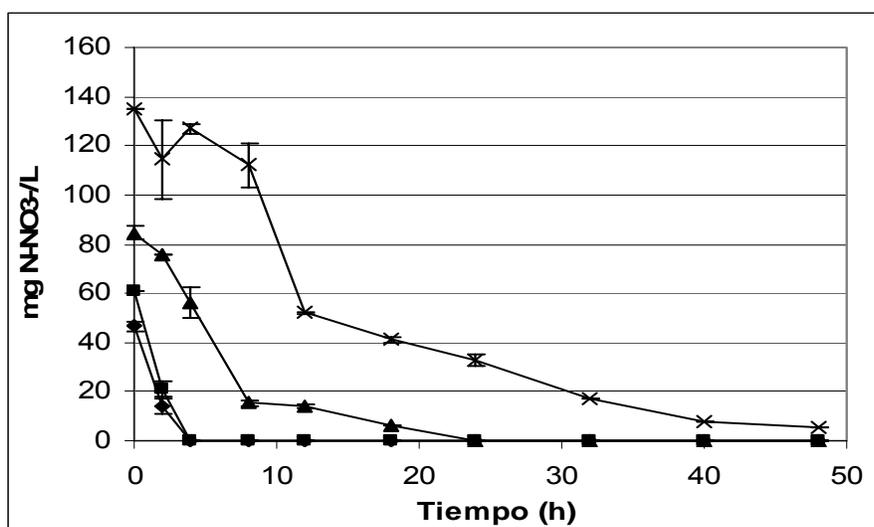


Figura 4.5. Perfiles de reducción de NO_3^- en un proceso desnitrificante con *p*-cresol en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro. 0 ppm S^{2-} (●), 25 ppm S^{2-} (■), 50 ppm S^{2-} (▲), 100 ppm S^{2-} (×)

Durante la reducción de nitrato se observaron 2 fases bien definidas en los cultivos en presencia de 50 y 100 ppm S^{2-} . Durante las primeras horas de incubación, se llevó a cabo una reducción mayor de nitrato, seguida de una segunda fase en la que la reducción del nitrato ocurre más lentamente. Analizando las Figuras 4.3, 4.5 y 4.6, se sugiere que la primera fase de reducción de nitrato está acoplada a la oxidación de *p*-cresol y sulfuro. Por otro lado, durante la segunda etapa de reducción de nitrato, en la que ya no había *p*-cresol y sulfuro disponibles, las únicas fuentes reductoras aprovechables eran los intermediarios de la oxidación de ambos sustratos. Sin embargo, como se explicó anteriormente, los intermediarios carbonados no fueron oxidados una vez consumido el *p*-cresol. Por lo tanto, se sugiere que la reducción del nitrato, durante la segunda fase, estuvo ligada a la oxidación de los intermediarios azufrados (S^0) a sulfato. Lo anterior, es corroborado por la producción de sulfato durante ese mismo periodo de incubación (Figura 4.6). Además, se observó que las velocidades de consumo de nitrato obtenidas durante la segunda fase disminuyeron más del 80%, comparadas con las obtenidas en la primera fase (Tabla 4.5), lo cual sugiere que la oxidación de los intermediarios azufrados fue la etapa limitante del proceso desnitrificante. Por otra parte, las velocidades de consumo de nitrato obtenidas durante la primera fase descrita anteriormente, a todas las concentraciones de sulfuro probadas, fueron mayores que la $q_{\text{NO}_3^-}$ obtenida en el cultivo control sin sulfuro. Una posible explicación a este aumento podría ser la relación de primer orden que guardan la $q_{\text{NO}_3^-}$ y la concentración de nitrato, ya

que ésta fue aumentando simultáneamente con el incremento en la concentración de sulfuro. Además, no se observó un efecto significativo del sulfuro sobre las $q_{\text{NO}_3^-}$ obtenidas en los cultivos organolitotróficos. En efecto, la disminución de $q_{\text{NO}_3^-}$, conforme aumentó la concentración de sulfuro a 50 ppm y 100 ppm S^{2-} , fue sólo del 3% y 10%, respectivamente, en comparación con la $q_{\text{NO}_3^-}$ obtenida a la concentración de 20 ppm S^{2-} (Tabla 4.5). Como se indicó anteriormente, los resultados sugieren que los efectos inhibitorios observados en los cultivos desnitrificantes, podrían ser atribuibles más bien a los intermediarios azufrados que se formaron en los cultivos y no al sulfuro propiamente.

En todos los cultivos, la reducción de nitrato a N_2 fue incompleta. Los Y_{N_2} fueron menores que 0.67 (Tabla 4.3) y no se observó una relación directa del N_2 producido, con respecto a la concentración de sulfuro presente. De forma contrastante, los experimentos con 25 y 100 ppm de sulfuro presentaron los menores rendimientos de producción de N_2 , mientras que el mayor rendimiento de producción de N_2 ocurrió en presencia de 50 ppm de sulfuro. El sulfuro tuvo un efecto significativo en la acumulación de NO_2^- . Se puede observar que ésta fue mayor cuando el sulfuro estuvo presente, pues el menor porcentaje de acumulación de nitrito fue en ausencia de sulfuro (Tabla 4.4). Esta acumulación de NO_2^- podría explicarse por dos aspectos distintos. Por un lado, se sugiere que el sulfuro inhibió la enzima nitrito reductasa, debido a la precipitación de Fe y Cu, los cuales son parte del sitio activo de esta enzima (Knowles, 1982; Mateju y col., 1992). Por otra parte, la reducción de nitrito fue afectada durante un largo periodo de incubación, en el que la fuente de energía principal fue el intermediario azufrado (azufre elemental), el cual ha sido reportado como un sustrato de lenta oxidación en procesos desnitrificantes (Reyes-Avila y col., 2004; Cardoso y col., 2006; Aranda-Tamaura y col., 2007; Meza-Escalante y col., 2008). Estos efectos sobre la reducción de nitrito también se reflejaron sobre las $q_{\text{NO}_2^-}$, las cuales disminuyeron a todas las concentraciones de sulfuro evaluadas, en porcentajes mayores al 40%, comparadas con el control sin sulfuro (Tabla 4.5).

De manera general, también se observó la acumulación de N_2O , aunque en menor porcentaje al de NO_2^- , lo que sugiere que los efectos inhibitorios de los compuestos azufrados (sulfuro y azufre elemental) sobre el proceso desnitrificante, se presentaron principalmente sobre la reducción de nitrito (Tabla 4.4 y Tabla 4.5). No se detectó amonio al final de la prueba en todos los cultivos, lo cual indica que no ocurrió la RDNA.

Tabla 4.4. Balance de compuestos nitrogenados (en %) del proceso desnitrificante a diferentes concentraciones de sulfuro.

S^{2-} (mg/L)	% N_2	% NO_2^-	% total recuperado	% N_2O (de balance) ^a
0	48.4	23.2	71.6	28.4
25	37.7	56.2	93.9	6.1
50	67	43	110	--
100	39.8	41.8	85.5*	14.5

* 3.9 % quedó como $N-NO_3^-$

^a El % N_2O se determinó de acuerdo al balance de N, con la siguiente ecuación:

$$N-NO_3^- \text{ inoculado} = N-NO_2^- + N-NO_3^- + N-N_2O + N_2 \text{ (presente en los cultivos a las 48h)}$$

Tabla 4.5. Velocidades específicas de consumo de sustratos del proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro.

S^{2-} (mg/L)	^a $q_{NO_3^-}$	[*] $q_{NO_2^-}$	$q_{p\text{-cresol}}$	$q_{S^{2-}}$
0	200 ± 8.0	14.4 ± 3.0	180 ± 4.0	--
25	344 ± 40	6.0 ± 1.0	288 ± 14 (117 ± 5.7) ^b	166 ± 17 (45 ± 4.3)
50	333 ± 40 52.7 ± 6.0 ^c	6.2 ± 1.0	300 ± 20 (121 ± 8.1)	400 ± 7 (100 ± 1.8)
100	308 ± 10 33.3 ± 1.1 ^c	8.6 ± 1.5	111 ± 8.0 (45 ± 3.2)	248 ± 7 (62 ± 1.7)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d. ^bLas velocidades señaladas entre paréntesis, están reportadas en términos de equivalentes de electrones (meq /g SSV d). ^c $q_{NO_3^-}$ determinadas en una segunda fase de reducción de NO_3^- . ^{*} $q_{NO_2^-}$ representa la velocidad de reducción de NO_2^- y fue determinada después de haberse consumido el NO_3^- .

A todas las concentraciones de sulfuro evaluadas, se logró el consumo total del mismo durante las primeras 12 horas de incubación. Sin embargo, sólo en presencia de 25 y 50 ppm de sulfuro, ocurrió una oxidación importante del sulfuro hasta sulfato. Por el contrario, a la concentración de 100 ppm S^{2-} , la producción de sulfato fue casi nula (Figura 4.6).

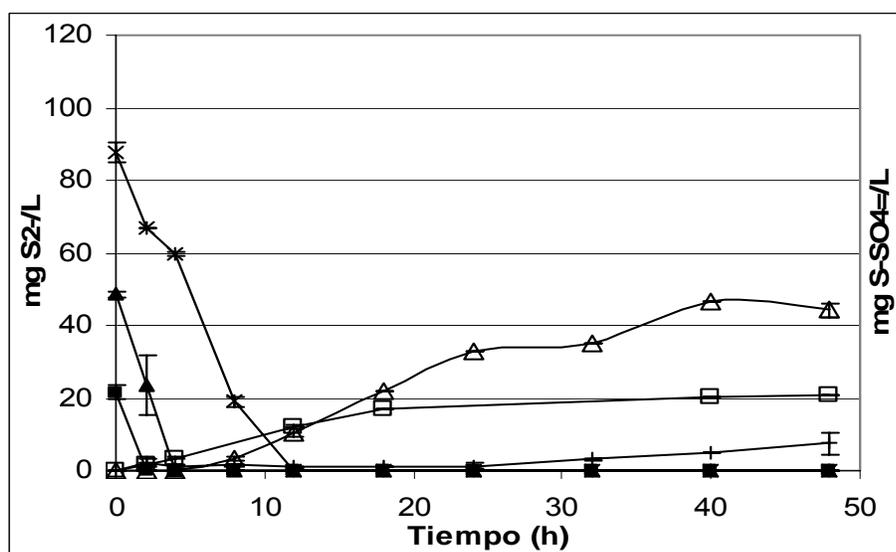


Figura 4.6. Perfiles de consumo de S^{2-} y formación de sulfato en un proceso desnitrificante con *p*-cresol en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro. Consumo de S^{2-} : a: 25 ppm S^{2-} (■), 50 ppm S^{2-} (▲), 100 ppm S^{2-} (×); formación de SO_4^{2-} : a: 25 ppm S^{2-} (□), 50 ppm S^{2-} (Δ), 100 ppm S^{2-} (+)

La acumulación de intermediarios azufrados fue transitoria a las concentraciones de sulfuro más bajas (25 y 50 ppm S^{2-}), obteniéndose Y_{SO_4} mayores que 0.90 (Tabla 4.3). Por otra parte, se detectó una coloración blanquecina en los cultivos con 100 ppm de sulfuro, sugiriendo la formación de S^0 , el cual ha sido reportado como intermediario de la ruta de oxidación anaerobia del sulfuro (Visser, 1995; Janssen, 1996; Trouve y col., 1998; Reyes-Avila y col., 2004; Sierra-Alvarez y col., 2005; Cardoso y col., 2006). Lo anterior, pudiera explicar el bajo Y_{SO_4} observado a la concentración más alta de sulfuro (Tabla 4.3).

Analizando de manera general los cultivos desnitrificantes, se observó un ligero aumento de $Y_{HCO_3^-}$ en los cultivos en los que se añadió sulfuro, comparado con el control incubado sin éste (~10%, Tabla 4.3). Lo anterior, podría deberse a una mayor concentración de nitrato disponible, comparado con el cultivo control sin sulfuro, ya que la concentración del nitrato aumentó a la par que la concentración de sulfuro en los cultivos. Los resultados sugieren que, durante las primeras horas de incubación, el proceso desnitrificante que predominó fue el organotrófico. El predominio de la desnitrificación organotrófica también se reflejó en las tasas de consumo de ambas fuentes de energía evaluadas. En efecto, las $q_{p-cresol}$ fueron mayores a las $q_{S^{2-}}$ a las concentraciones de 25 y 50 ppm de S^{2-} , en términos de equivalentes de electrones. No obstante, a 100 ppm de S^{2-} , la $q_{S^{2-}}$ fue mayor a la $q_{p-cresol}$ (Tabla 4.5), lo cual concuerda con los estudios reportados por Reyes-Avila y col. (2004) y Meza-Escalante y

col. (2008), quienes encontraron $q_{S^{2-}}$ mayores que las tasas de consumo de los compuestos carbonados evaluados (acetato y *p*-cresol, respectivamente).

La velocidad específica de consumo de *p*-cresol ($q_{p\text{-cresol}}$) fue mayor a las concentraciones de 25 y 50 ppm S^{2-} , comparada con la obtenida en el control sin sulfuro (Tabla 4.5), lo que sugiere que el sulfuro no afecta de manera negativa el consumo del *p*-cresol bajo estas condiciones. Sin embargo, la $q_{p\text{-cresol}}$ obtenida a 100 ppm S^{2-} disminuyó un 38% con respecto al control sin sulfuro, sugiriendo que bajo estas condiciones sí hubo un efecto inhibitorio sobre la oxidación de *p*-cresol. Este efecto podría ser explicado por la formación de azufre elemental, el cual se adhirió a la biomasa desnitrificante limitando la transferencia de masa entre los sustratos y la biomasa.

Con respecto a las velocidades específicas de formación, obtenidas para los productos carbonados, nitrogenados y azufrados, éstas fueron menores que las velocidades de consumo de los diferentes sustratos (Tablas 4.5 y 4.6). Por ejemplo, la $q_{NO_3^-}$ fue mayor de 2 a 3 veces que la q_{N_2} y de 36 a 57 veces mayor que la $q_{NO_2^-}$ (Tabla 4.5) a todas las concentraciones de sulfuro evaluadas, lo que sugiere el efecto del sulfuro sobre la ruta desnitrificante, en específico sobre la reducción de NO_2^- . Además, la $q_{HCO_3^-}$ disminuyó conforme se incrementó la concentración de sulfuro y fue menor que la $q_{p\text{-cresol}}$ en todos los casos. Esta observación sugiere también un efecto inhibitorio de los compuestos azufrados sobre el proceso de mineralización del *p*-cresol. Por otro lado, el efecto del sulfuro fue más evidente en la $q_{SO_4^{2-}}$, ya que ésta fue desde 7 hasta 31 veces menor que la $q_{S^{2-}}$. Se sugiere que la disminución en $q_{SO_4^{2-}}$ fue debida a la formación de azufre elemental, que se observó en los cultivos por la presencia de gránulos blanquecinos (no cuantificados), lo que pudo originar los bajos rendimientos obtenidos, particularmente en los cultivos con 100 ppm S^{2-} , debido a limitaciones en el transporte de masa por la presencia de los gránulos de azufre elemental adheridos a la biomasa.

De acuerdo a los resultados de esta etapa, se observó la capacidad de un lodo desnitrificante de llevar a cabo la eliminación simultánea de nitrato, sulfuro y *p*-cresol con eficiencias de consumo del 100%. Este proceso desnitrificante mostró rendimientos tan altos como $Y_{N_2} = 0.66$, $Y_{SO_4^{2-}} = 0.91$ y $Y_{HCO_3^-} = 0.8$, hasta los 50 ppm de sulfuro. No obstante, a 100 ppm de sulfuro, el proceso desnitrificante mostró una disminución de 15 y 92% para Y_{N_2} y $Y_{SO_4^{2-}}$, respectivamente. Bajo estas últimas condiciones, la oxidación hasta sulfato fue casi nula, aún cuando el sulfuro fue consumido completamente, evidenciando que la oxidación de azufre elemental a sulfato fue la etapa limitante del proceso. La baja $q_{SO_4^{2-}}$ obtenida estuvo

vinculada a una acumulación de nitrito, sugiriendo que la reducción de nitrito fue la etapa más afectada bajo estas condiciones.

Tabla 4.6. Velocidades específicas de formación de productos del proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro.

S^{2-} (mg/L)	$^a q_{N_2}$	$q_{HCO_3^-}$	$q_{SO_4^{2-}}$
0	35 ± 2.0	100 ± 5.0	--
20	106 ± 10	156 ± 16	16 ± 4.0
50	167 ± 30	150 ± 30	56 ± 0.5
100	105 ± 11	126 ± 10	8.0 ± 0.2

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d

Reactores con una alta concentración de biomasa, como los UASB, podrían ser aplicados para la eliminación simultánea de estos tres contaminantes y así disminuir las limitaciones antes mencionadas. En efecto, la concentración utilizada en el presente estudio, fue sólo de 1 g SSV/L, la cual es mucho menor comparada con la que es aplicada en este tipo de reactores (30-50 g SSV/L, Lettinga y col., 1980). Lo anterior ha sido corroborado por Sierra-Alvarez y col. (2005) quienes reportaron altas eficiencias en la eliminación simultánea de estos tres contaminantes en un reactor UASB.

4.2.3 Efecto de mediadores redox sobre el proceso desnitrificante organolitotrófico.

La concentración de NO_3^- utilizada en los ensayos fue la estequiométrica para oxidar ambos sustratos, sulfuro y *p*-cresol. Las quinonas utilizadas fueron seleccionadas con base en resultados previos que indican efectos favorables de las mismas en diferentes procesos biológicos (Cervantes y col., 2002; Coates y col., 2002; Aranda-Tamaura y col., 2007; Cervantes y col., 2008). Las quinonas evaluadas fueron: antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS), 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lawsona) y 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS).

4.2.3.1 Efecto de tres quinonas en un proceso desnitrificante organolitotrófico.

En estos ensayos sólo se probó una concentración de sulfuro (20 ppm S^{2-}) y, con base en estos resultados, se programaron los siguientes experimentos, en presencia de la quinona

que mostró el efecto más significativamente favorable sobre el proceso. Los controles incluyeron cultivos en ausencia de sulfuro y también en ausencia de quinonas. Dentro de los controles bióticos realizados estuvieron con los donadores de electrones (de forma independiente) en ausencia de NO_3^- . También, se incluyeron controles con la fuente oxidante (NO_3^-) en ausencia de ambos donadores de electrones. Como controles abióticos, sólo se realizó el experimento con sulfuro, en presencia de cada una de las quinonas evaluadas, de manera independiente. La concentración de quinona aplicada en todos los ensayos fue de $50 \mu\text{M}$.

4.2.3.1.1 Estudio del efecto de la lawsona.

Se realizaron los cultivos controles, en ausencia de sulfuro, para evaluar la capacidad del lodo desnitrificante para oxidar el *p*-cresol en presencia de lawsona. Los perfiles respiratorios obtenidos se muestran en la Figura 4.7.

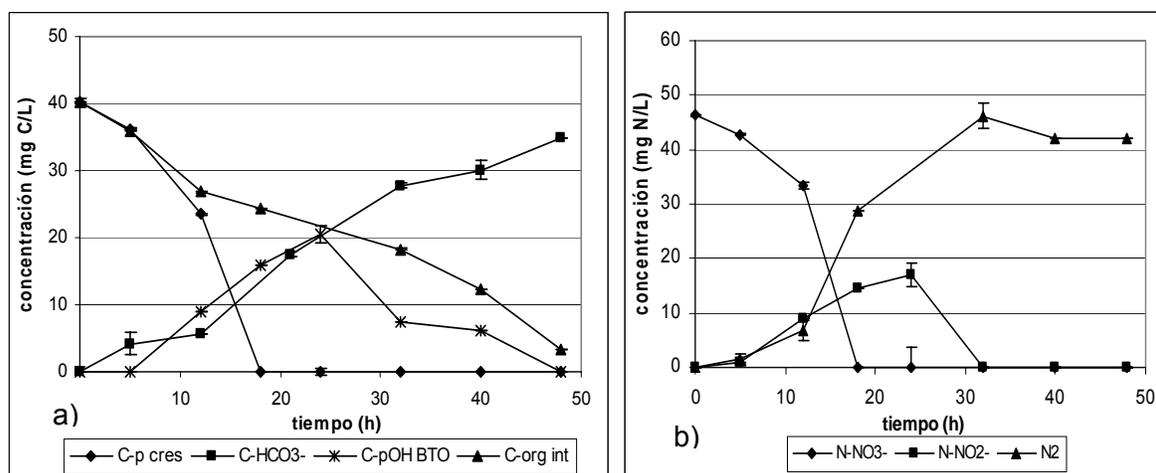


Figura 4.7. Ensayo en lote de *p*-cresol y nitrato con lawsona: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados.

Este proceso requirió de un mayor tiempo de incubación para el consumo del *p*-cresol, comparado con el cultivo desarrollado en ausencia de lawsona, el cual fue de 12 h (Figuras 4.1a y Figura 4.7a), debido a que la velocidad específica de consumo de sustrato fue menor (Tablas 4.2 y 4.7). Además, se observa en la Figura 4.7a el efecto de la lawsona sobre el proceso de oxidación del *p*-cresol, manifestándose en una mayor acumulación transitoria de intermediarios, particularmente del *p*-OH benzoato, el cual ha sido reportado como intermediario aromático de la ruta de oxidación anaerobia del *p*-cresol (Häggblom y col., 1990; Heider y Fuchs, 1997; Strand, 2000). De igual manera, se requirió también de un

mayor tiempo para el consumo del NO_3^- , respecto de aquellos sin la lawsona (18h vs 12h, Figuras 4.2a y 4.7b). Sin embargo, se observa un efecto favorable de la lawsona sobre la reducción de NO_2^- , lo cual se traduce en una menor acumulación de este intermediario. Las velocidades específicas respiratorias se muestran en la Tabla 4.7. Los valores presentados entre paréntesis representan el cambio, en porcentaje, observado en las velocidades específicas en presencia de la lawsona y sin este mediador redox.

Tabla 4.7. Velocidades específicas respiratorias del cultivo organotrófico en presencia de lawsona.

	$^a q_{\text{NO}_3^-}$	$^* q_{\text{NO}_2^-}$	q_{N_2}	$q_{p\text{-cresol}}$	$q_{\text{HCO}_3^-}$
sin lawsona	97 ± 1.0	21 ± 1.2	50 ± 1.0	75 ± 2.0	41 ± 2.0
con lawsona	60 ± 1.0 (-38%)	67 ± 6.5 (+224%)	44 ± 2.0 (-12%)	66 ± 1.0 (-12%)	26 ± 2.0 (-37%)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d. ^{*} $q_{\text{NO}_2^-}$ fue determinada después de haberse consumido el NO_3^- en ambos casos.

Se puede observar un efecto heterogéneo de la lawsona en las velocidades específicas, tanto de consumo como de formación de productos. En efecto, la $q_{p\text{-cresol}}$ disminuyó un 12%, mientras que la $q_{\text{HCO}_3^-}$ disminuyó en mayor proporción. Los resultados sugieren que la lawsona afectó negativamente el transporte de electrones durante las primeras etapas del proceso desnitrificante, disminuyendo la mayoría de las velocidades específicas. Por el contrario, la $q_{\text{NO}_2^-}$ aumentó 224% con respecto al control, lo cual estuvo vinculado a una menor acumulación de nitrito y un mayor Y_{N_2} en los cultivos con lawsona (Tabla 4.8). Aún cuando las velocidades de consumo de los sustratos disminuyeron, las eficiencias de consumo fueron del 100% y los rendimientos de formación de productos aumentaron. El $Y_{\text{HCO}_3^-}$ aumentó comparado con el control sin la quinona, debido a que la acumulación del $p\text{-OH}$ benzoato observada fue sólo transitoria y se logró su consumo total durante el periodo de incubación. El Y_{N_2} aumentó 38%, posiblemente debido al efecto favorable de la lawsona sobre la reducción de nitrito (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Rendimientos de producción del cultivo organotrófico en ausencia y presencia de lawsona.

	$Y_{\text{HCO}_3^-}$	Y_{N_2}
Sin lawsona	0.77 ± 0.02	0.66 ± 0.01
con lawsona	0.87 ± 0.02 (+13%)	0.91 ± 0.03 (+38%)

^{*}Los rendimientos de formación de producto fueron determinados a las 48 h.

El efecto de la lawsona sobre el proceso desnitrificante, en presencia de *p*-cresol y sulfuro, se observa en la Figura 4.8. Los resultados indican nuevamente el efecto de la lawsona reflejado en un mayor tiempo de consumo de los sustratos, comparado con el control organolitotrófico en ausencia de quinona. Se sugiere nuevamente un efecto de la lawsona en la ruta de oxidación del *p*-cresol, particularmente en la oxidación del *p*-OH benzoato, lo cual resultó en la acumulación transitoria del mismo (Figura 4.8a). Los resultados indican que existen efectos combinados del sulfuro y de la lawsona sobre la ruta de reducción del nitrato. Por su parte, el agregar sulfuro al proceso, ocasionó una mayor acumulación de NO_2^- , la cual fue permanente en ausencia de lawsona (Figura 4.2b); en cambio, la presencia de lawsona ejerció un efecto favorable sobre la reducción de NO_2^- , promoviendo una menor acumulación de este intermediario y una mayor producción de N_2 (Figura 4.8b).

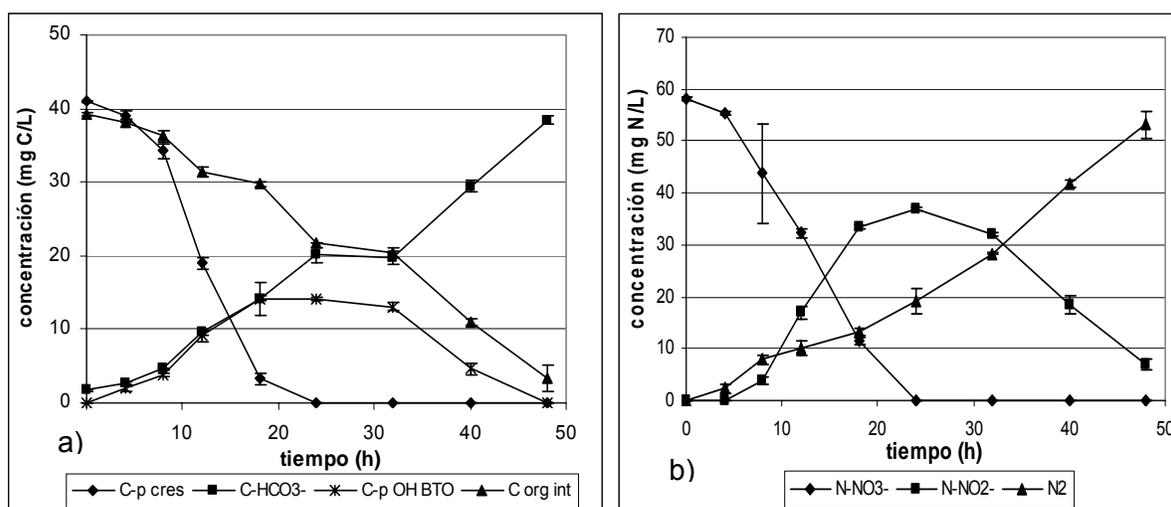


Figura 4.8. Ensayo en lote de *p*-cresol, sulfuro y nitrato con lawsona: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados.

La lawsona no ocasionó un efecto significativo en la ruta de oxidación de sulfuro, pues se obtuvo una oxidación casi completa de éste a SO_4^{2-} (Figura 4.9). El Y_{SO_4} tuvo un valor de 0.95 ± 0.07 y no presentó un cambio considerable con respecto al control sin quinona (Tabla 4.11).

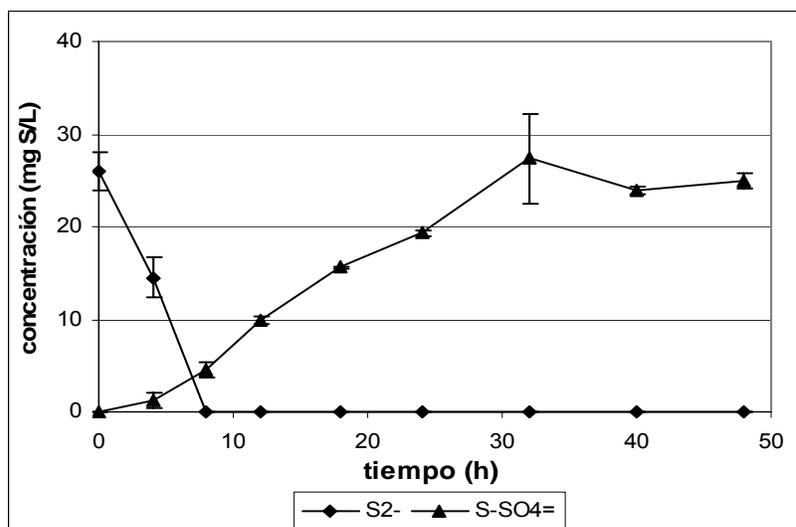


Figura 4.9. Perfiles de compuestos azufrados para el cultivo en lote organolitotrófico con lawsona.

De manera general, la lawsona no tuvo un efecto significativo ni en las velocidades de consumo de sustrato (Tabla 4.9) ni en las de formación de producto (Tabla 4.10), pues su variación en presencia de la quinona fue menor que 10%, comparadas con las obtenidas en ausencia de este mediador redox. No obstante, la $q_{\text{HCO}_3^-}$ disminuyó 28%, en presencia de la lawsona, sugiriendo un efecto inhibitorio de la misma sobre la oxidación de los intermediarios carbonados. Por otra parte, la velocidad de formación de N_2 no fue significativamente alterada por la presencia de la lawsona, a pesar de que la reducción de NO_3^- sí fue afectada. Lo anterior, podría ser explicado por la menor acumulación de nitrito observada al final de los cultivos, como puede verse cuando se comparan los perfiles de las Figuras 4.2b y 4.8b. Esta menor acumulación de NO_2^- fue resultado del aumento en la $q_{\text{NO}_2^-}$ manifestada en estos cultivos como efecto de la adición de lawsona (Tabla 4.9). El efecto favorable de la lawsona sobre la reducción de nitrito podría relacionarse también, al aumento de $q_{\text{SO}_4^{=}}$. Como se ha mencionado, la reducción de nitrito coincide con la oxidación de azufre elemental a sulfato, la cual ha mostrado ser la etapa limitante del proceso. El aumento de $q_{\text{NO}_2^-}$ y $q_{\text{SO}_4^{=}}$ ocasionaría que la exposición de los cultivos a nitrito y azufre elemental disminuyera y, de esta manera, atenuar sus efectos inhibitorios.

Aranda-Tamaura y col. (2007) observaron una disminución de la $q_{\text{S}_2^-}$ debido a la presencia de lawsona en un cultivo desnitrificante litotrófico, lo cual contrasta con nuestros resultados que no evidenciaron un efecto significativo de esta quinona sobre este parámetro.

Tabla 4.9. Velocidades específicas de consumo de sustrato del cultivo organolitotrófico en presencia de lawsona.

	^a q _{NO₃⁻}	*q _{NO₂⁻}	q _{p-cresol}	q _{S₂-}
sin lawsona	81 ± 2.0	11 ± 0.7	55 ± 1.0	82 ± 8.0
con lawsona	70 ± 2.0 (-13%)	31 ± 1.7 (+186%)	60 ± 1.0 (+9%)	81 ± 6.0 (-1.2%)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d. *q_{NO₂⁻} fue determinada después de haberse consumido el NO₃⁻ en ambos casos.

Tabla 4.10. Velocidades específicas de formación de producto del cultivo organolitotrófico en presencia de lawsona.

	^a q _{N₂}	q _{HCO₃⁻}	q _{SO₄⁼}
sin lawsona	28 ± 1.0	29 ± 2.0	19 ± 1.0
con lawsona	26 ± 1.0 (-7.1%)	21 ± 2.0 (-28%)	22 ± 2.0 (+15%)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d.

De igual manera que en el proceso desnitrificante organotrófico, la lawsona tiene un efecto favorable en el metabolismo, originando un incremento en los rendimientos de formación de producto de HCO₃⁻ y N₂ (Tabla 4.11), aun cuando las velocidades respiratorias disminuyeron (Tablas 4.9 y 4.10). Las eficiencias de consumo de los sustratos (E_{p-cresol}, E_{S₂-} y E_{NO₃⁻}) fueron del 100%.

Tabla 4.11. Rendimientos de producción del cultivo organolitotrófico en ausencia y presencia de lawsona.

	*Y _{HCO₃⁻}	Y _{N₂}	Y _{SO₄⁼}
sin lawsona	0.70 ± 0.01	0.62 ± 0.01	1 ± 0.02
con lawsona	0.94 ± 0.02 (+ 34%)	0.91 ± 0.04 (+ 47%)	0.95 ± 0.07

*Los rendimientos de formación de producto fueron determinados a las 48 h.

4.2.3.1.2 Estudio del efecto de la AQDS.

La adición de la AQDS en los cultivos desnitrificantes permitió que el tiempo requerido para el consumo de los sustratos disminuyera de 12 a 8 horas, comparado con el proceso organotrófico en ausencia de esta quinona (Figura 4.10).

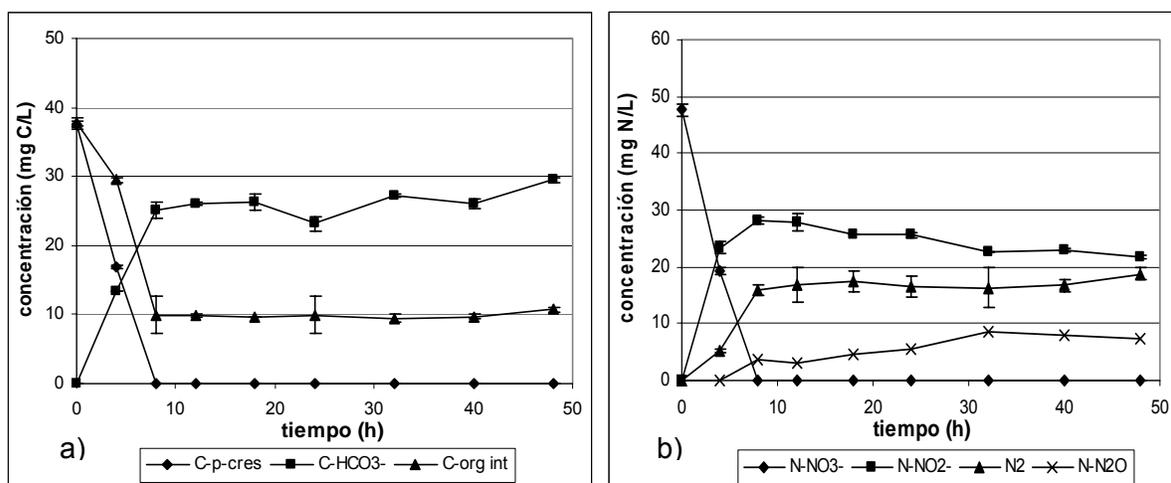


Figura 4.10. Ensayo en lote de *p*-cresol y nitrato con AQDS: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados.

La AQDS favoreció la oxidación de los intermediarios aromáticos carbonados pues no se presentó una acumulación de éstos, ni se detectó la presencia del *p*-OH benzoato, ni de los otros intermediarios aromáticos, de la ruta de oxidación anaerobia propuesta para el *p*-cresol (Hägglom y col., 1990; Heider y Fuchs, 1997; Strand, 2000). También se vio un aumento de $q_{p\text{-cresol}}$ y $q_{\text{HCO}_3^-}$ mayores que 80%, comparadas con las obtenidas en ausencia de esta quinona (Tabla 4.12). Aun cuando se requirió también de un tiempo menor para el consumo del NO_3^- , se observó un efecto inhibitorio de la AQDS sobre la reducción del NO_2^- y de N_2O , presentándose la acumulación de ambos intermediarios (Figura 4.10b).

Tabla 4.12. Velocidades específicas respiratorias del cultivo organotrófico en presencia de AQDS.

	^a $q_{\text{NO}_3^-}$	* $q_{\text{NO}_2^-}$	q_{N_2}	$q_{p\text{-cresol}}$	$q_{\text{HCO}_3^-}$
sin AQDS	97 ± 1.0	21 ± 1.2	50 ± 1.0	75 ± 2.0	41 ± 2.0
con AQDS	170 ± 2.0	4.8 ± 0.2	70 ± 4.0	136 ± 3.0	90 ± 5.0
	(+75%)	(-77%)	(+40%)	(+81%)	(+120%)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d. * $q_{\text{NO}_2^-}$ fue determinada después de haberse consumido el NO_3^- en ambos casos.

La AQDS tuvo un efecto significativo sobre las velocidades específicas respiratorias. La $q_{\text{HCO}_3^-}$ se incrementó en un porcentaje mayor al de la $q_{p\text{-cresol}}$, lo que indicó que, además del efecto de la AQDS en el transporte de electrones, también influyó en la ruta metabólica. El consumo mayoritario de los intermediarios a HCO_3^- fue durante las primeras horas de la prueba (Figura 4.10a). En el caso de los compuestos nitrogenados, el incremento en la q_{N_2}

es menor que el de la $q_{\text{NO}_3^-}$. Esta observación es explicable si se considera que la AQDS originó un efecto favorable en la velocidad de reducción de NO_3^- , pero ocasionó un efecto inhibitorio sobre las enzimas responsables de la reducción de nitrito y óxido nitroso. Además, la disminución que se obtuvo de $q_{\text{NO}_2^-}$, con respecto al control sin la AQDS, podría explicar la acumulación de este intermediario.

Aunque la AQDS aumentó significativamente las velocidades específicas respiratorias, el $Y_{\text{HCO}_3^-}$ prácticamente se mantuvo constante, con respecto a lo observado en ausencia del mediador redox (Tabla 4.13). Lo anterior, podría ser explicado por una acumulación permanente de intermediarios carbonados, observada hasta el final del periodo de incubación (Figura 4.10a).

Tabla 4.13. Rendimientos de producción del cultivo organotrófico en ausencia y presencia de AQDS.

	$Y_{\text{HCO}_3^-}$		Y_{N_2}	
sin AQDS	0.77 ± 0.02		0.66 ± 0.01	
con AQDS	0.78 ± 0.03	(+1.3%)	0.40 ± 0.01	(-39%)

*Los rendimientos de formación de producto fueron determinados a las 48 h.

En el caso de Y_{N_2} , se observa una disminución del 39%, con respecto al control sin quinona, posiblemente vinculado al efecto inhibitorio de la AQDS sobre la reducción de NO_2^- y N_2O en estos experimentos (Figura 4.10b).

Para el cultivo desnitrificante organolitotrófico con *p*-cresol, sulfuro y AQDS, los perfiles de concentraciones de los compuestos carbonados y nitrogenados, obtenidos en los cultivos en lote, se muestran en la Figura 4.11.

Se observó el efecto favorable de la AQDS sobre la ruta de oxidación del *p*-cresol, eliminando la acumulación de los intermediarios aromáticos, aunque hubo acumulación permanente de una pequeña concentración de otros intermediarios carbonados no identificados (Figura 4.11a). De manera contraria al efecto favorable de la AQDS sobre la oxidación de los intermediarios carbonados, ocurrió una mayor acumulación de NO_2^- (Figura 4.11b), lo cual indicó un efecto inhibitorio de la AQDS sobre la nitrito reductasa. Este efecto de la AQDS pudo haberse sumado al efecto inhibitorio de los compuestos azufrados, lo cual se manifestó en una mayor acumulación de NO_2^- , comparado con el cultivo organotrófico sin AQDS. Sin embargo, la presencia de sulfuro no ocasionó acumulación de N_2O , como se había observado en el cultivo organotrófico con AQDS.

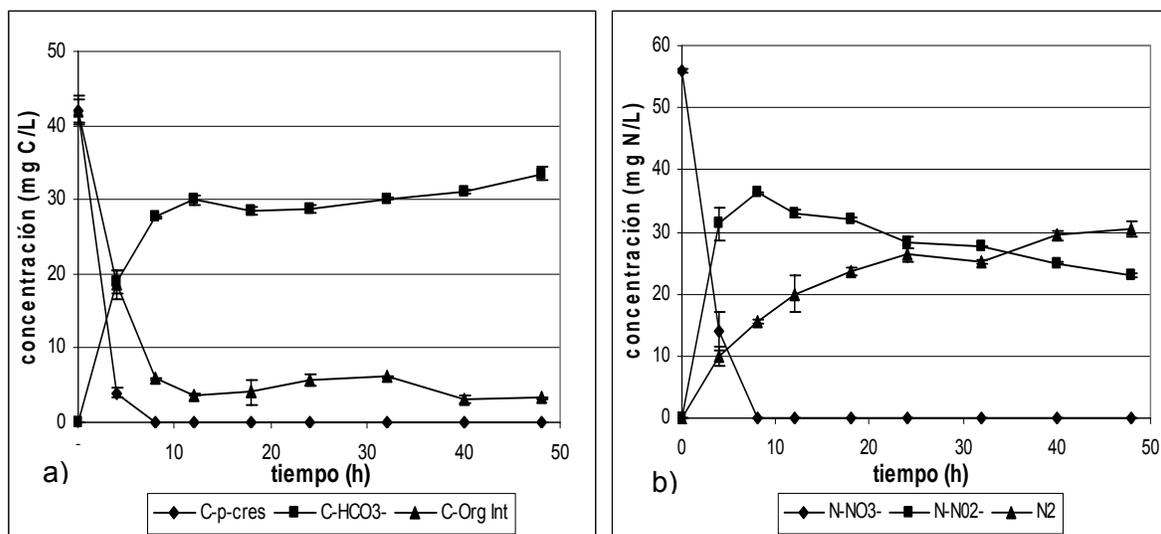


Figura 4.11. Ensayo en lote de *p*-cresol, sulfuro y nitrato con AQDS: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados.

La adición de la AQDS no ocasionó algún efecto en la oxidación de sulfuro debido a que se obtuvo la oxidación completa del sulfuro a SO_4^{2-} . En términos de velocidades específicas, $q_{\text{S}^{2-}}$ y $q_{\text{SO}_4^{2-}}$, tampoco se presentó un cambio significativo respecto a los cultivos organolitotróficos en ausencia de la quinona (Tabla 4.14 y Tabla 4.15).

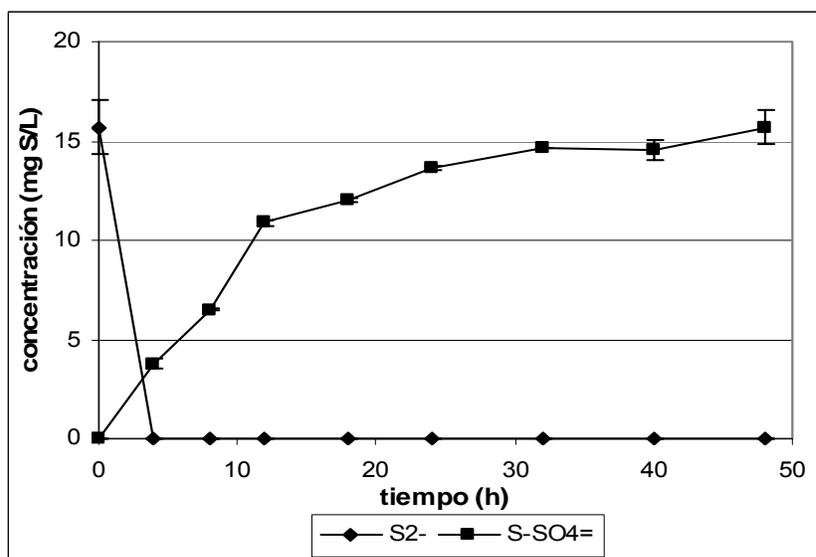


Figura 4.12. Perfiles de compuestos azufrados para el cultivo en lote organolitotrófico con AQDS.

Tabla 4.14. Velocidades específicas de consumo de sustrato del cultivo organolitotrófico en presencia de AQDS.

	^a q _{NO₃⁻}	*q _{NO₂⁻}	q _{p-cresol}	q _{S₂-}
sin AQDS	81 ± 2.0	11 ± 0.7	55 ± 1.0	82 ± 8.0
con AQDS	230 ± 1.5 (+184%)	6.8 ± 0.01 (-37%)	210 ± 8.0 (+282%)	86 ± 10 (+5%)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d. *q_{NO₂⁻} fue determinada después de haberse consumido el NO₃⁻ en ambos casos.

Tabla 4.15. Velocidades específicas de formación de producto del cultivo organolitotrófico en presencia de AQDS.

	^a q _{N₂}	q _{HCO₃⁻}	q _{SO₄⁼}
sin AQDS	28 ± 1.0	29 ± 2.0	19 ± 1.0
con AQDS	54 ± 9.0 (+93%)	100 ± 10 (+245%)	19 ± 1.0

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d.

La AQDS tuvo un efecto significativo en las velocidades específicas respiratorias de los compuestos carbonados y nitrogenados, aunque, como se mencionó anteriormente, no se observó ningún efecto sobre el proceso de oxidación de sulfuro (Tabla 4.14 y 4.15). El aumento de q_{NO₃⁻} fue mayor al aumento de q_{N₂} en presencia de la AQDS. En cambio, q_{NO₂⁻} presenta una disminución con respecto al cultivo sin quinona, lo cual implicó una mayor acumulación de nitrito en los cultivos con AQDS.

Por otro lado, el incremento ocasionado por la AQDS sobre las velocidades de consumo de *p*-cresol y formación de HCO₃⁻, fue mayor que 200%. Sin embargo, el valor de q_{p-cresol} es 2 veces mayor al valor de la q_{HCO₃⁻} (210 vs 100 mg/g SSV.d)) lo que se vio reflejado en una acumulación de los intermediarios carbonados, aunque ésta fue menor comparada con la obtenida en el control sin quinona. En general, la acumulación de intermediarios, tanto carbonados como nitrogenados, prevaleciente hasta el final del periodo de incubación, ocasionó que los rendimientos del proceso desnitrificante sean menores que 1 (Tabla 4.16). Sin embargo, las eficiencias de consumo de los sustratos no se afectaron por la AQDS y los valores de E_{p-cresol}, E_{S₂} y E_{NO₃⁻} fueron del 100%.

Aun cuando la AQDS incrementa significativamente las velocidades específicas respiratorias, se observó que la ruta metabólica se conservó, lo cual se manifestó en rendimientos similares a los obtenidos en ausencia de la quinona (Tabla 4.16). La oxidación completa a sulfato, en presencia de la AQDS, también fue observada por Aranda-Tamaura y col. (2007),

aunque en su caso, ocurrió en un proceso desnitrificante litotrófico, con sulfuro como única fuente de energía.

Tabla 4.16. Rendimientos de producción del cultivo organolitotrófico en ausencia y presencia de AQDS.

	$Y_{\text{HCO}_3^-}$	Y_{N_2}	$Y_{\text{SO}_4^{2-}}$
sin AQDS	0.70 ± 0.01	0.62 ± 0.01	1 ± 0.02
Con AQDS	0.82 ± 0.02 (+14%)	0.54 ± 0.03 (-13%)	1 ± 0.06

*Los rendimientos de formación de producto fueron determinados a las 48 h.

4.2.3.1.3 Estudio del efecto de la NQS.

Se realizaron los cultivos desnitrificantes organotróficos con *p*-cresol y NQS, en los cuales no se presentó la acumulación de *p*-OH benzoato, ni la acumulación de otro intermediario aromático. Estos resultados sugieren que la NQS promovió la oxidación de los intermediarios aromáticos de la ruta de oxidación del *p*-cresol (Figura 4.13a). Este efecto favorable de la NQS sobre la oxidación de los intermediarios carbonados, se tradujo en una mayor producción de HCO_3^- durante el tiempo de incubación (48h), lo que a su vez se reflejó en un $Y_{\text{HCO}_3^-}$ cercano a 1 (Tabla 4.17). Durante las primeras horas del cultivo, la NQS favoreció la reducción del nitrato y la tasa de formación de N_2 (Figura 4.13b). Ya consumido todo el nitrato, esta quinona mostró un efecto inhibitorio sobre la reducción del NO_2^- y de N_2O , presentándose la acumulación de ambos intermediarios del proceso desnitrificante, los cuales no desaparecieron por completo durante el periodo de incubación (Figura 4.13b). Lo anterior, propició un rendimiento de producción de N_2 muy bajo, con un valor de 0.41 ± 0.02 (Tabla 4.17).

Tabla 4.17. Rendimientos de producción del cultivo organotrófico en ausencia y presencia de NQS.

	$Y_{\text{HCO}_3^-}$	Y_{N_2}
sin NQS	0.95 ± 0.01	0.56 ± 0.03
con NQS	0.93 ± 0.01 (-2%)	0.41 ± 0.02 (-27%)

*Los rendimientos de formación de producto fueron determinados a las 48 h.

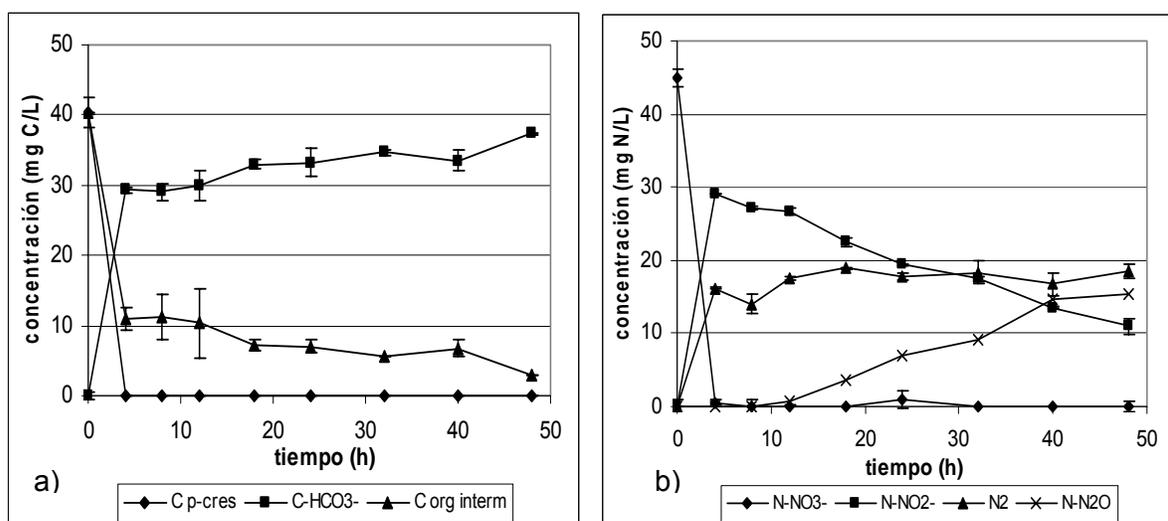


Figura 4.13. Ensayo en lote de *p*-cresol y nitrato con NQS: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados.

Las eficiencias de consumo de los sustratos ($E_{\text{NO}_3^-}$ y $E_{p\text{-cresol}}$) fueron del 100%. La NQS tuvo un efecto significativo sobre las velocidades específicas respiratorias (Tabla 4.18). Este efecto en las velocidades, al igual que con la AQDS, fue favorable (Tabla 4.12) y contrario al obtenido con la lawsona (Tabla 4.7).

La $q_{\text{HCO}_3^-}$ disminuyó un 23%, respecto al control sin quinona. Contrario a esto, la $q_{p\text{-cresol}}$ aumentó, con respecto al control. Estos resultados indican que, además del efecto de la NQS en el consumo del *p*-cresol, también tuvo un efecto inhibitorio en la oxidación de los intermediarios a HCO_3^- durante las primeras horas de la prueba, ya que existe una mayor acumulación de intermediarios carbonados no identificados (Figura 4.13a). La acumulación de NO_2^- podría ser explicada por la disminución de $q_{\text{NO}_2^-}$, con respecto a la $q_{\text{NO}_3^-}$, ya que se encontró una relación $q_{\text{NO}_3^-}/q_{\text{NO}_2^-}$ de 27. Lo anterior sugiere que, aunque la NQS presenta un efecto favorable en la velocidad de consumo de NO_3^- , la quinona produce un efecto inhibitorio sobre la reducción de intermediarios nitrogenados.

Tabla 4.18. Velocidades específicas respiratorias del cultivo organotrófico en presencia de NQS.

	$^a q_{\text{NO}_3^-}$	$^* q_{\text{NO}_2^-}$	q_{N_2}	$q_{p\text{-cresol}}$	$q_{\text{HCO}_3^-}$
sin NQS	186 ± 1.0	6.6 ± 0.3	66 ± 10	192 ± 8.0	171 ± 2.0
con NQS	276 ± 9.0	10.2 ± 0.5	97 ± 1.0	242 ± 13	132 ± 1.0
	(+48%)	(+54%)	(+47%)	(+26%)	(-23%)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d. ^{*} $q_{\text{NO}_2^-}$ fue determinada después de haberse consumido el NO_3^- en ambos casos.

Los cultivos desnitrificantes, con *p*-cresol y sulfuro como fuente de energía, en presencia de NQS se presentan en la Figura 4.14.

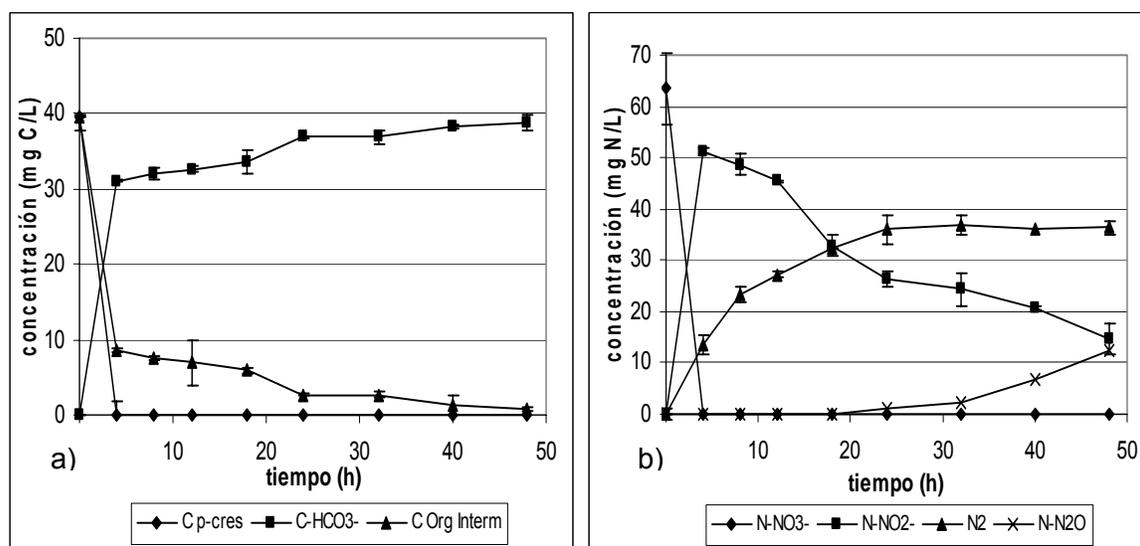


Figura 4.14. Ensayo en lote desnitrificante con *p*-cresol y sulfuro como fuente de energía en presencia de NQS: a) perfil de compuestos carbonados y b) perfil de compuestos nitrogenados.

Se observó una menor acumulación de intermediarios carbonados que en condiciones organotróficas (Figuras 4.13a y 4.14a). En la Figura 4.14b se muestra una mayor acumulación de NO₂⁻, con respecto al cultivo organotrófico, la cual prevaleció hasta el final de la prueba, lo que indicó un efecto inhibitorio sobre la reducción de nitrito. Al comparar estos perfiles respiratorios con los controles sin NQS, se observó una menor acumulación de NO₂⁻ al final de la prueba. Como se mencionó anteriormente, este efecto inhibitorio sobre la reducción de nitrito, podría ser atribuido a la lenta oxidación del azufre elemental a sulfato, ya que la q_{SO_4} disminuyó (Tabla 4.20). Además el sulfuro había sido oxidado completamente desde las primeras cuatro horas de incubación por lo que podría ser descartado como el agente inhibitorio durante esta etapa del proceso (Figura 4.15).

También se observó la acumulación de N₂O, lo cual, no coincidió con lo reportado por Aranda-Tamaura y col. (2007), quienes no obtuvieron acumulación ni de NO₂⁻, ni de N₂O en un proceso litotrófico desnitrificante. Estas diferencias pudieran deberse a la concentración de biomasa utilizada por los autores, la cual fue alrededor de 4 veces mayor a la utilizada en los ensayos del presente trabajo.

Se observó un incremento del 115% en la $q_{\text{NO}_2^-}$, con respecto al control sin NQS, aunque ocurrió una disminución de sólo el 9% en la q_{N_2} . Lo anterior podría deberse a aspectos cinéticos, pues la $q_{\text{NO}_2^-}$ es casi 20 veces menor que la $q_{\text{NO}_3^-}$ (Tabla 4.19).

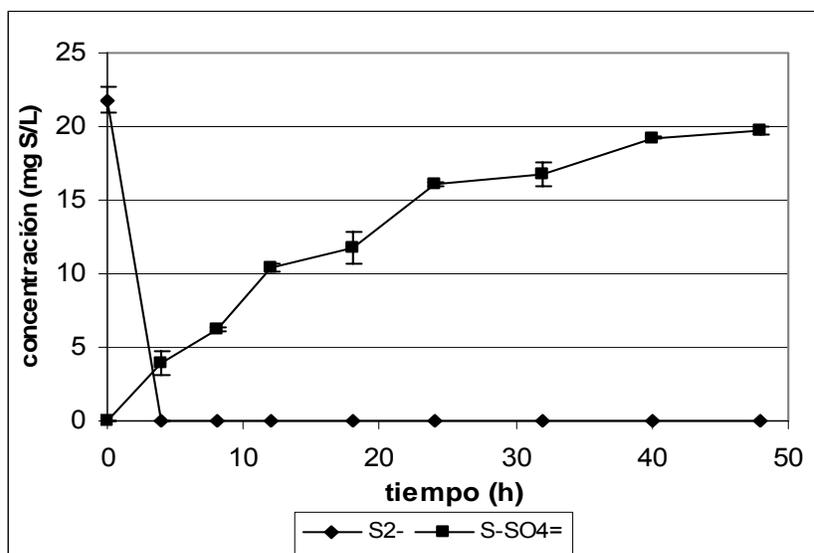


Figura 4.15. Perfiles de compuestos azufrados para el cultivo en lote organolitotrófico con NQS.

Contrario a los resultados observados con las otras quinonas, la NQS aumentó significativamente las $q_{\text{S}_2^-}$. El efecto de esta quinona sobre la oxidación del sulfuro fue también observado por Aranda-Tamaura y col. (2007), quienes reportaron $q_{\text{S}_2^-}$ mayores, en comparación a cultivos realizados en ausencia de NQS. Estos resultados fueron obtenidos en un proceso desnitrificante litotrófico con sulfuro como única fuente de electrones, a concentraciones desde 100 hasta 2500 mg S^{2-}/L (Aranda-Tamaura y col. 2007). Aun con el incremento ocasionado por la NQS sobre $q_{\text{S}_2^-}$, las $q_{\text{NO}_2^-}$ y q_{N_2} , disminuyeron, lo cual sugiere que este proceso desnitrificante no fue afectado específicamente por el sulfuro, como se mencionó anteriormente.

Tabla 4.19. Velocidades específicas de consumo de sustrato del cultivo organolitotrófico en presencia de NQS.

	^a $q_{\text{NO}_3^-}$	[*] $q_{\text{NO}_2^-}$	$q_{\text{p-cresol}}$	$q_{\text{S}_2^-}$
sin NQS	301 ± 15	9.3 ± 0.3	193 ± 8.0	115 ± 1.0
con NQS	363 ± 25 (+21%)	20 ± 0.9 (+115%)	252 ± 1.0 (+31%)	131 ± 5.0 (+14%)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d. ^{*} $q_{\text{NO}_2^-}$ fue determinada después de haberse consumido el NO_3^- en ambos casos.

Tabla 4.20. Velocidades específicas de formación de producto del cultivo organolitotrófico en presencia de NQS.

	^a q _{N2}	q _{HCO3⁻}	q _{SO4=}
sin NQS	77 ± 9.0	109 ± 2.0	25 ± 1.0
con NQS	70 ± 9.0 (-9%)	137 ± 1.0 (+26%)	20 ± 1.0 (-20%)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d.

Aun cuando la NQS incrementa significativamente las velocidades específicas respiratorias, su efecto en los rendimientos no fue tan significativo (Tabla 4.21). En el caso del rendimiento de formación de N₂, éste presenta una disminución debido a la acumulación de NO₂⁻ y de N₂O. De igual manera que en los otros cultivos organolitotróficos, la ruta de oxidación del sulfuro a sulfato no fue afectada significativamente, observándose un Y_{SO4=} cercano a 1. La velocidad de oxidación de sulfuro se vio mejorada. Las eficiencias de consumo de los sustratos no fueron afectadas por la NQS y los valores de E_{p-cresol}, E_{S2} y E_{NO3⁻} fueron del 100%.

Tabla 4.21. Rendimientos de producción del cultivo organolitotrófico en ausencia y presencia de NQS.

	Y _{HCO3⁻}	Y _{N2}	Y _{SO4=}
sin NQS	0.95 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.8 ± 0.03
con NQS	0.98 ± 0.03 (+3%)	0.57 ± 0.02 (-12%)	0.9 ± 0.01 (+13%)

4.2.3.1.4 Comparación de los efectos de las tres quinonas sobre el proceso desnitrificante organolitotrófico.

Con base en los resultados obtenidos en los cultivos desnitrificantes, en presencia de las diferentes quinonas, se puede decir que es importante analizar el tipo de quinona a aplicar al proceso, debido a las implicaciones que pueda tener en todas las etapas del mismo, así como en las eficiencias y rendimientos finales. Es importante señalar que todas las quinonas estudiadas fueron suministradas a niveles catalíticos (50 µM) y, a pesar de esta baja concentración, se notaron efectos significativos en el proceso desnitrificante. Esta observación puede ser explicada por el mecanismo de reciclaje de las quinonas, que ocurre durante una gran diversidad de procesos de oxidorreducción reportados en la literatura (Lovley y col., 1999; Field y col., 2000; Aranda-Tamaura y col., 2007).

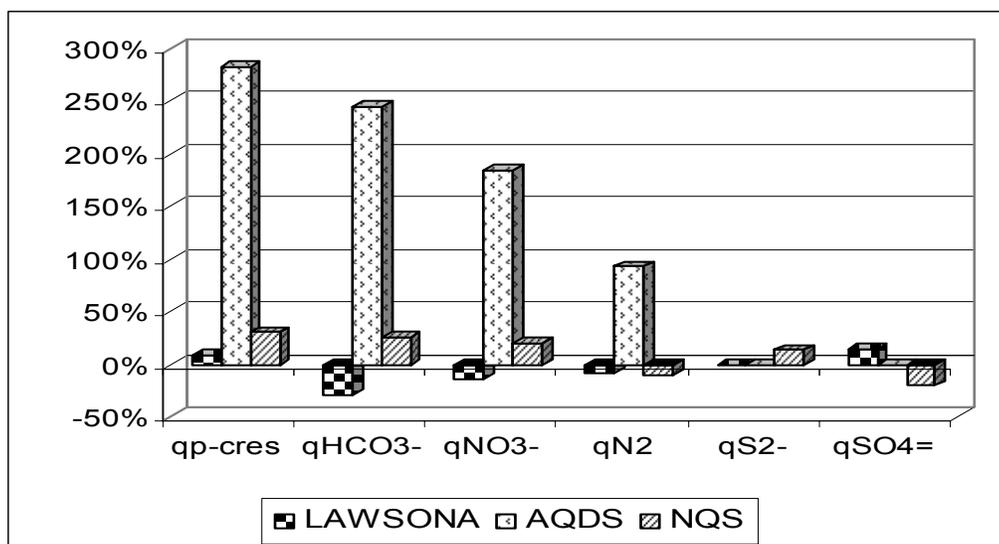


Figura 4.16. Porcentaje del efecto de las quinonas en las velocidades específicas respiratorias de los cultivos en lote desnitrificantes con *p*-cresol y sulfuro como fuente de energía, respecto a su correspondiente control sin quinona.

Se observaron dos efectos contrarios de las quinonas en los experimentos realizados, relacionados con aspectos fisiológicos y bioquímicos. Por un lado, la lawsona disminuyó las velocidades de consumo de los sustratos, pero favoreció la reducción de NO_2^- y con ello, se logró un mayor Y_{N_2} , comparado con el obtenido con las otras quinonas. De forma contraria, la AQDS y NQS favorecieron el aumento de las velocidades de consumo de los sustratos, pero, de manera paralela, la acumulación de intermediarios nitrogenados, con la consecuente disminución de Y_{N_2} (Figura 4.16 y Figura 4.17).

La NQS también presentó un efecto favorable en la velocidad de consumo de sulfuro. En cambio, la AQDS y la lawsona no presentaron un efecto significativo sobre el proceso de oxidación de sulfuro (Figura 4.17).

Con base en los resultados descritos y en estudios realizados por Aranda-Tamaura y col. (2007), quienes observaron una mayor tasa de oxidación del sulfuro en presencia de la NQS, se consideró esta quinona para realizar los experimentos descritos en la siguiente sección. Esta decisión fue apoyada también por el incremento en la $Y_{\text{SO}_4=}$ promovido por la NQS (Figura 4.17).

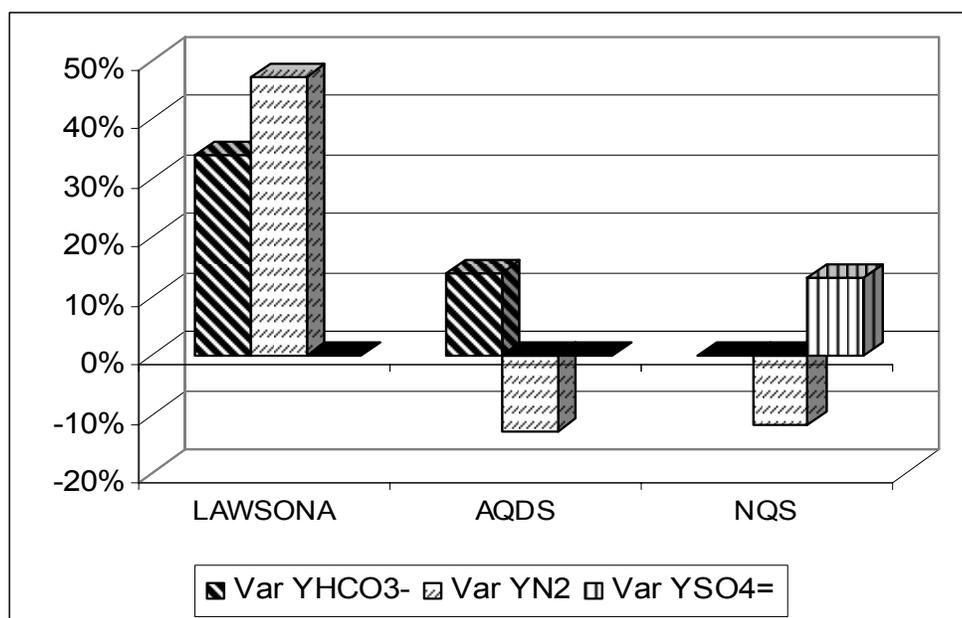


Figura 4.17. Porcentaje del efecto de las quinonas en los rendimientos de formación de productos de los cultivos desnitrificantes con *p*-cresol y sulfuro como fuente de energía, respecto a su correspondiente control sin quinona. (Var Y: Variación del rendimiento)

4.2.3.2 Efecto de la NQS en un proceso desnitrificante organolitotrófico con *p*-cresol y diferentes concentraciones de sulfuro como fuente de energía.

El objetivo de estos experimentos fue evaluar el efecto de un mediador redox (NQS) sobre un proceso desnitrificante organolitotrófico a diferentes concentraciones de sulfuro y una concentración constante de *p*-cresol. Ambos sustratos, como fuentes de electrones, fueron incorporados en los cultivos a concentraciones estequiométricas con respecto al aceptor final de electrones. Es decir, la concentración de nitrato fue aumentando, conforme incrementaba la concentración de sulfuro en los ensayos. Para hacer más evidente el efecto de la NQS en los cultivos, se decidió aumentar la concentración 10 veces, con respecto a los experimentos anteriores, partiendo de la hipótesis que una mayor concentración de la quinona, favorecería un consumo más rápido del sulfuro. A su vez, se esperaba que al oxidarse más rápidamente el sulfuro, se disminuirían sus efectos inhibitorios sobre el proceso desnitrificante, particularmente sobre la reducción de nitrito. Las condiciones experimentales aplicadas en estos estudios fueron las mismas que las utilizadas en los trabajos donde se incrementó la concentración de sulfuro en ausencia de la quinona.

La oxidación del *p*-cresol demandó un mayor tiempo para su consumo conforme aumentó la concentración de sulfuro (Figura 4.18), lo cual sugiere un efecto inhibitorio del sulfuro sobre la desnitrificación organotrófica. No obstante, después de 32 horas de incubación, el *p*-cresol fue consumido completamente en todos los casos. Es decir, las $E_{p\text{-cresol}}$ fueron del 100% bajo todas las condiciones experimentales.

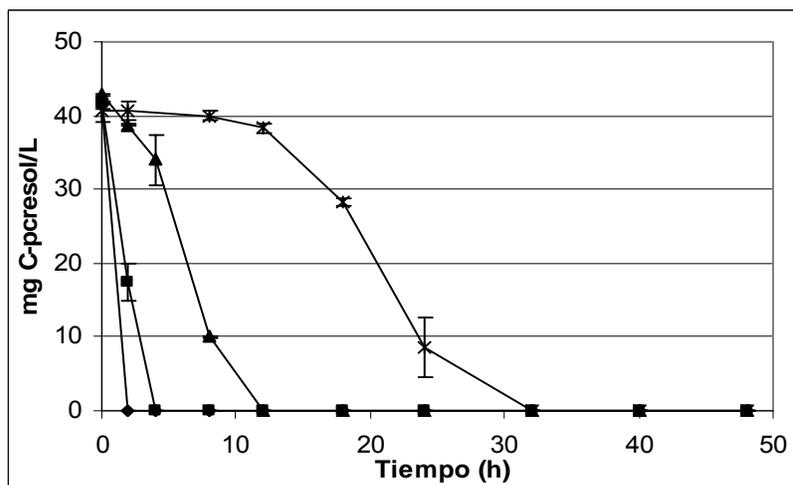


Figura 4.18. Perfiles de consumo de *p*-cresol en un proceso desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μM de NQS. 0 ppm S^{2-} (♦), 25 ppm S^{2-} (■), 50 ppm S^{2-} (▲), 100 ppm S^{2-} (×)

La NQS, a la concentración añadida, favoreció la oxidación completa del *p*-cresol, en todas las concentraciones de sulfuro ensayadas, por lo que no se detectaron intermediarios carbonados al final del periodo de incubación (Figura 4.19). Es importante señalar que, en ninguno de los experimentos realizados en el presente trabajo, se había observado la oxidación completa del compuesto fenólico, lo que sugiere el efecto de la NQS, a la concentración utilizada, sobre la ruta de oxidación del *p*-cresol, particularmente, la oxidación de los intermediarios. Esta mineralización completa del *p*-cresol dio como resultado valores de $Y_{\text{HCO}_3^-}$ cercanos a 1 en todos los ensayos realizados (Tabla 4.22).

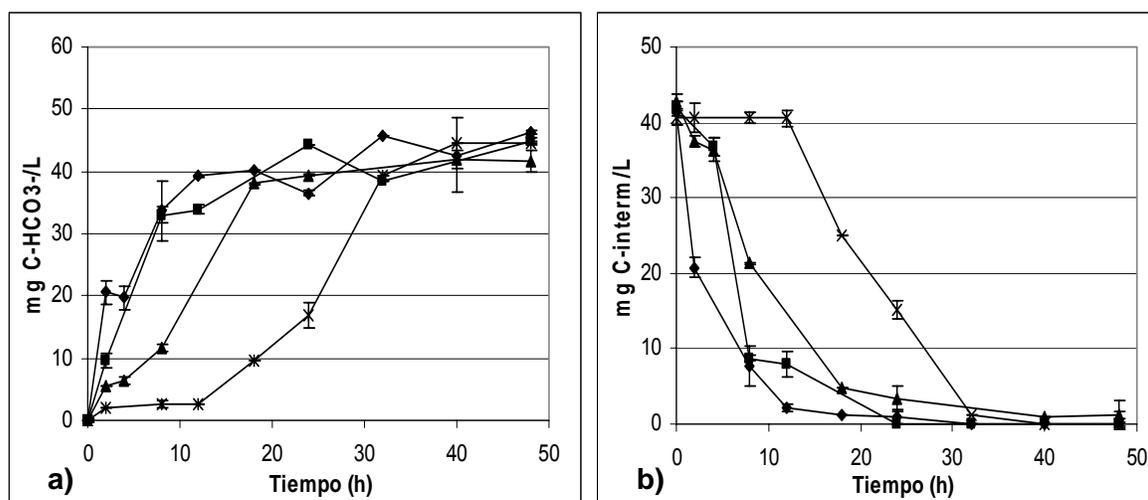


Figura 4.19. Perfiles de formación de los productos de la oxidación del *p*-cresol: a) C-HCO₃⁻ y b) C-Intermediarios, en un proceso desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μM de NQS. 0 ppm S²⁻ (◆), 25 ppm S²⁻ (■), 50 ppm S²⁻ (▲), 100 ppm S²⁻ (×)

Tabla 4.22. Rendimientos de formación de productos del proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μM de NQS.

S ²⁻ (mg/L)	Y _{HCO₃⁻}	Y _{N₂}	Y _{SO₄⁼}
0	1.1 ± 0.01	1.0 ± 0.013	--
25	1.07 ± 0.001	0.67 ± 0.001	0.86 ± 0.03
50	0.97 ± 0.05	0.60 ± 0.011	0.31 ± 0.009
100	1.1 ± 0.009	0.28 ± 0.006	0.075 ± 0.02

*Los rendimientos de formación de producto fueron determinados a las 48 h.

Puede observarse que, en los casos en los que los cultivos estuvieron expuestos a 50 y 100 ppm de S²⁻, la reducción de nitrato no fue completa (Figura 4.20), obteniéndose eficiencias de consumo (E_{NO₃⁻}) de 84.38 ± 0.015 y 74.95 ± 0.004, respectivamente. Lo anterior pudo deberse a un efecto combinado ocasionado por la presencia del sulfuro y la quinona, ya que en los cultivos realizados con diferentes concentraciones de sulfuro, en ausencia de la NQS, siempre se obtuvo un consumo completo del nitrato (Figura 4.5). Al aplicar una concentración relativamente alta de NQS (500 μM), es posible que se haya formado un complejo NQS-sulfuro que alteró la ruta desnitrificante mermando la eficiencia del mismo. Este complejo NQS-sulfuro ha sido sugerido también por otros autores, con resultados similares, es decir, una disminución de las eficiencias del proceso (Perlinger y col., 1996; Perlinger y col., 1998).

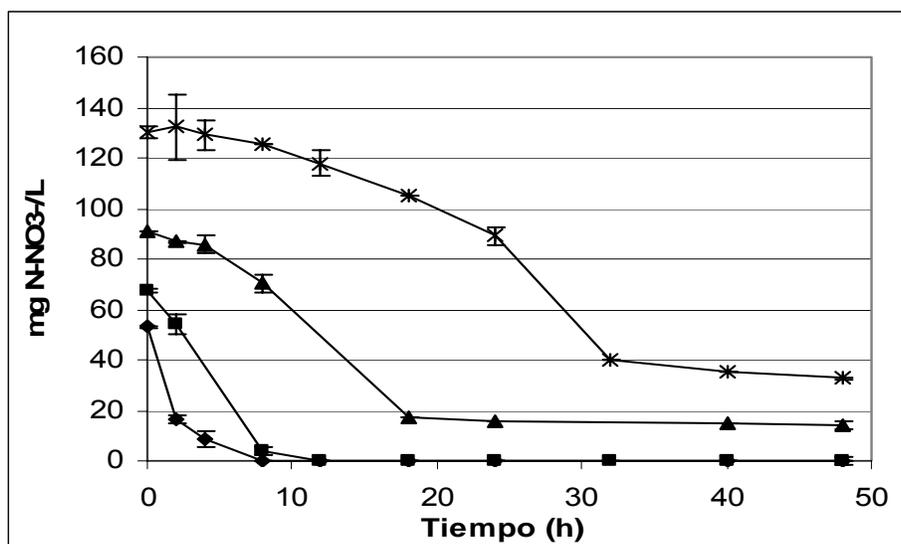


Figura 4.20. Perfiles de reducción de nitrato en un proceso desnitrificante con *p*-cresol en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 µM de NQS. 0 ppm S²⁻ (◆), 25 ppm S²⁻ (■), 50 ppm S²⁻ (▲), 100 ppm S²⁻ (×)

Por otra parte, la formación de N₂ disminuyó a medida que aumentó la concentración de sulfuro en los cultivos (Tabla 4.22). Sólo en el cultivo en ausencia de sulfuro se obtuvo el 100 % de recuperación del N₂, lo que sugiere que el sulfuro tuvo un efecto sobre la producción de N₂, aun estando presente la quinona. De acuerdo al balance de compuestos nitrogenados, el porcentaje de recuperación de N₂ fue disminuyendo conforme aumentó la concentración de sulfuro, debido a la acumulación de intermediarios, principalmente NO₂⁻ (Tabla 4.23)

En párrafos previos se ha sugerido que el efecto negativo del sulfuro sobre la reducción de nitrito podría deberse a la precipitación de Fe y Cu, los cuales son sitios activos de esta enzima. Sin embargo, la NQS ejerció un efecto favorable sobre la reducción de nitrito, en los cultivos en ausencia de sulfuro y a la concentración de 25 ppm S²⁻, ya que, al final de la prueba, no se detectó NO₂⁻, en contraste con los experimentos sin NQS en los que siempre hubo acumulación de este intermediario. Para las concentraciones de 50 y 100 ppm de S²⁻, en los cultivos con NQS, se presentó una disminución de al menos un 10% del N-NO₂⁻ acumulado, comparado con el control sin quinona. Hubo también formación de N₂O, aunque en menor porcentaje al de NO₂⁻, lo que sugiere que el efecto de los compuestos azufrados fue principalmente sobre la reducción de nitrito.

Al igual que los cultivos sin NQS, no se detectó amonio al final de la prueba en los cultivos incluyendo esta quinona, lo cual indica que no ocurrió la RDNA.

Tabla 4.23. Balance de compuestos nitrogenados (en %) del proceso desnitrificante a diferentes concentraciones de sulfuro en presencia de 500 μM de NQS.

Concentración de S^{2-}	% N_2	% NO_2^-	% total recuperado	% N_2O (de balance) ^a
0 ppm	100	0	100	0
25 ppm	66.9	0	66.9	33.1
50 ppm	50.9	27.3	93.8*	6.14
100 ppm	20.7	33.2	78.9*	21.9

* 15.6% quedó como N-NO_3^- para 50 ppm S^{2-} y 25.04%, para 100 ppm S^{2-} .

^a El % N_2O se determinó de acuerdo al balance de N, con la siguiente ecuación:

$$\text{N-NO}_3^- \text{ inoculado} = \text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^- + \text{N-N}_2\text{O} + \text{N}_2 \text{ (presente en los cultivos a las 48h)}$$

Con respecto a los perfiles de oxidación del sulfuro y producción de sulfato, éstos se muestran en la Figura 4.21. Nuevamente se logró el consumo total del sulfuro bajo todas las condiciones experimentales. Es decir, las eficiencias de consumo ($E_{\text{S}^{2-}}$) fueron del 100% en todos los casos.

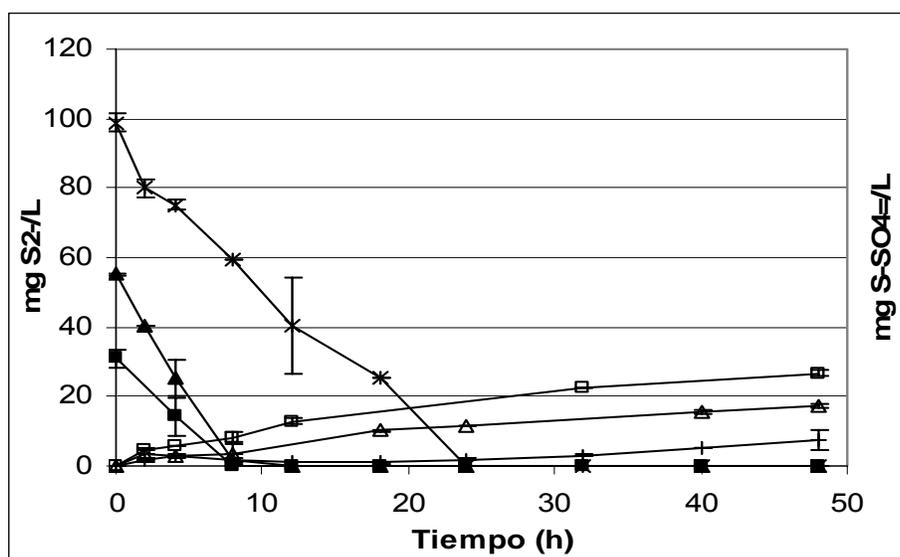


Figura 4.21. Perfiles de consumo de S^{2-} y formación de sulfato en un proceso desnitrificante con *p*-cresol en presencia de diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μM de NQS. Consumo de S^{2-} a: 25 ppm S^{2-} (■), 50 ppm S^{2-} (▲), 100 ppm S^{2-} (×); formación de SO_4^{2-} a: 25 ppm S^{2-} (□), 50 ppm S^{2-} (Δ), 100 ppm S^{2-} (+)

Al comparar los perfiles respiratorios obtenidos en estos cultivos con los obtenidos en ausencia de NQS (Figura 4.6), se observa, de manera general, un aumento en los tiempos necesarios para la oxidación del sulfuro, lo que originó una disminución en las velocidades

de consumo de este compuesto (Tabla 4.24 y Tabla 4.5). Contrario a la hipótesis planteada en estos experimentos, el impacto de la quinona fue más bien negativo. El efecto inhibitorio de la NQS se reflejó en la disminución de las variables de respuesta utilizadas ($Y_{SO_4=}$, $q_{S^{2-}}$, $q_{SO_4=}$). La recuperación del sulfato no fue completa a ninguna de las concentraciones de sulfuro empleadas confirmando un efecto desfavorable de la NQS sobre el proceso de oxidación de sulfuro (Tabla 4.22 y Figura 4.22).

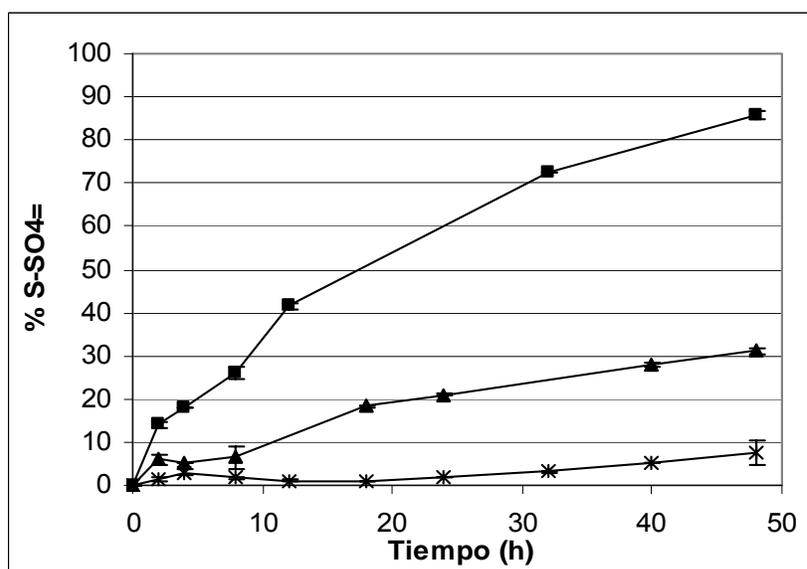


Figura 4.22. Porcentaje de recuperación de sulfato a diferentes concentraciones de sulfuro en presencia de 500 μM de NQS. 20 ppm S^{2-} (■), 50 ppm S^{2-} (▲), 100 ppm S^{2-} (×)

El porcentaje de recuperación del sulfato disminuyó conforme aumentó la concentración de sulfuro agregada (Figura 4.22), hasta alcanzar un valor casi nulo de recuperación, reflejado en un valor mínimo de $Y_{SO_4=}$ de 0.075 ± 0.02 para el cultivo con 100 ppm S^{2-} . En efecto, a los 25 ppm S^{2-} , el porcentaje de recuperación de sulfato disminuyó de 100 a 85%, mientras que a la concentración de 50 ppm el efecto de la NQS en la producción de sulfato fue mayor (91 al 30%). A diferencia del proceso sin quinona, la recuperación de sulfato no es completa desde la concentración de 25 ppm S^{2-} . En ambos casos (con y sin quinona) el proceso expuesto a 100 ppm no se recupera ni el 10% del sulfuro inicial como S-SO_4^{2-} .

Tabla 4.24. Velocidades específicas de consumo de sustratos del proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS.

S^{2-} (mg/L)	^a $q_{NO_3^-}$	[*] $q_{NO_2^-}$	$q_{p\text{-cresol}}$	$q_{S^{2-}}$
0	274 \pm 21	20.2 \pm 1.4	512 \pm 5.0	--
25	200 \pm 6.8	21.6 \pm 1.1	258 \pm 0.2 (104 \pm 0.1) ^b	96 \pm 8.0 (24 \pm 2.0)
50	89 \pm 14 3.1 \pm 0.4 ^c	10.8 \pm 1.0	145 \pm 3.4 (59 \pm 1.4)	231 \pm 7.3 (58 \pm 1.8)
100	136 \pm 2.2 15.7 \pm 0.2 ^c	9.4 \pm 0.9	83 \pm 4.9 (34 \pm 1.6)	135 \pm 0.2 (34 \pm 0.05)

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d. ^bLas velocidades entre paréntesis, representan las velocidades en equivalentes de electrones. ^c $q_{NO_3^-}$ determinadas en una segunda fase de reducción de NO_3^- . ^{*} $q_{NO_2^-}$ fue determinada después de haberse consumido el NO_3^- .

La velocidad de consumo de *p*-cresol decreció conforme aumentó la concentración de sulfuro, siendo hasta 2, 3 y 6 veces menor que la $q_{p\text{-cresol}}$ obtenida en el cultivo control en ausencia de sulfuro. Comparando las $q_{p\text{-cresol}}$ obtenidas en presencia de NQS con aquellas observadas sin esta quinona, sólo se vio un efecto favorable en ausencia de sulfuro (cultivo organotrófico) aumentando casi 3 veces (184%) la $q_{p\text{-cresol}}$. Estos resultados sugieren que la NQS tuvo un efecto negativo y estuvo relacionado con la presencia de sulfuro, pues la $q_{p\text{-cresol}}$ disminuyó desde la concentración de sulfuro más baja (25 ppm), lo cual no ocurrió en los cultivos realizados en ausencia de la NQS (Tabla 4.5). Algunos autores han documentado la formación de un complejo formado entre diferentes quinonas y el sulfuro, los cuales han mostrado efectos inhibitorios sobre diferentes procesos respiratorios (Perlinger y *col.*, 1996; Perlinger y *col.*, 1998). Al aplicar una concentración relativamente alta de NQS (500 μ M) en estos experimentos, es posible que se haya formado un complejo NQS-sulfuro que truncó el proceso desnitrificante mermando el proceso. Estos efectos inhibitorios también se manifestaron en la reducción del nitrato. En efecto, al comparar la $q_{NO_3^-}$ observada en ausencia de NQS, se observa que ésta tiene un aumento del 37% sólo en el cultivo organotrófico, pero disminuye hasta un 73% cuando está presente el sulfuro (Tabla 4.5 y Tabla 4.24). También se refleja un efecto negativo de la concentración de NQS, pues en los cultivos en ausencia de la quinona (a todas las concentraciones de sulfuro), las velocidades $q_{NO_3^-}$ fueron mayores (Tabla 4.5). De igual manera que en los cultivos en ausencia de la quinona, la reducción de nitrato a las concentraciones de 50 y 100 ppm de S^{2-} , se llevó a

cabo en dos fases. La primera fase fue vinculada principalmente a la oxidación de *p*-cresol y sulfuro, y la segunda fase, fue vinculada a la oxidación de los intermediarios azufrados, los cuales eran la única fuente reductora disponible. Esta segunda etapa fue más lenta que la primera (Tabla 4.24).

Con respecto a los compuestos azufrados, las velocidades de consumo de sulfuro aumentan hasta la concentración de 50 ppm de sulfuro, pero disminuye a los 100 ppm de S^{2-} indicando que no hay un efecto tóxico de este compuesto sobre el proceso desnitrificante. Lo anterior es confirmado por la oxidación completa de sulfuro observada en todos los cultivos desarrollados. La disminución de $q_{S^{2-}}$ sugiere más bien un efecto inhibitorio. Además, se observa que el proceso de oxidación de sulfuro se ve limitado por la acumulación de azufre elemental, lo que ocasiona la disminución de los rendimientos del proceso. Comparando con las velocidades obtenidas en los cultivos realizados en ausencia de la quinona, contrario a lo que se esperaba, las velocidades de consumo del sulfuro disminuyeron con la presencia de 500 μ M de NQS, en una forma constante, pues el intervalo de disminución fue entre el 42 y 46% en todas las concentraciones empleadas de sulfuro, con respecto al control sin quinona. Este efecto en las velocidades de consumo de sustrato llevó a la disminución de las velocidades de formación de productos mostrados en la Tabla 4.25.

Tabla 4.25. Velocidades específicas de formación de productos del proceso desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro y 500 μ M de NQS.

S^{2-} (mg/L)	$^a q_{N_2}$	$q_{HCO_3^-}$	$q_{SO_4^{2-}}$
0	90 \pm 20	75 \pm 15	--
25	75 \pm 7.5	101 \pm 6.4	24 \pm 2.0
50	70 \pm 9.0	47 \pm 3.9	18 \pm 5.0
100	42 \pm 9.0	75 \pm 10	7.0 \pm 2.0

^aLas velocidades específicas están definidas en mg/g SSV.d.

El efecto de los compuestos azufrados sobre las velocidades de formación de productos es evidente, ya que q_{N_2} y $q_{SO_4^{2-}}$ fueron disminuyendo conforme aumentaba la concentración de sulfuro en los cultivos. La $q_{S^{2-}}$, comparada con $q_{SO_4^{2-}}$ (Tablas 4.24 y 4.25) fue mayor para todas las concentraciones de sulfuro utilizadas. La relación $q_{S^{2-}}/q_{SO_4^{2-}}$ fue aumentando a medida que la concentración de sulfuro presente en el cultivo fue incrementándose, hasta

llegar a un valor de 20 a la concentración de 100 ppm de S^{2-} . Esto confirma el efecto de la quinona sobre la ruta de oxidación del sulfuro principalmente en la acumulación de intermediarios, pues la velocidad de consumo del sulfuro no se ve tan afectada como el proceso de oxidación de los intermediarios a sulfato. Se sugiere que el intermediario acumulado fue el azufre elemental por la presencia de gránulos de coloración blanquecina sobre la biomasa de los cultivos lo que pudiera limitar, como se argumentó en los experimentos en ausencia de quinona, la transferencia entre el microorganismo y los sustratos, reduciendo las tasas de oxidación y/o reducción en el proceso.

Al igual que en los experimentos sin quinona, las $q_{p-cresol}$ fue mayor que la $q_{S^{2-}}$, en términos de equivalentes de reducción, a la concentración más baja de sulfuro. Sin embargo, para el resto de las concentraciones de sulfuro no se encontró una diferencia significativa entre $q_{p-cresol}$ y $q_{S^{2-}}$.

Es importante señalar que, de manera general, la NQS originó efectos favorables en el cultivo organotrófico (0 ppm de S^{2-}), aumentando las velocidades de consumo de los sustratos así como los rendimientos de formación de productos.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La adición de sulfuro a un cultivo desnitrificante con *p*-cresol como fuente de energía, ejerció un efecto inhibitorio sobre el proceso respiratorio. La reducción de nitrito fue el proceso más afectado debido a un efecto de los compuestos azufrados, principalmente del azufre elemental. La oxidación de azufre elemental a sulfato representó el paso limitante del proceso.

Aunque las velocidades específicas respiratorias disminuyeron en presencia de Lawsona, se obtuvieron eficiencias de consumo del 100% y aumentaron significativamente los rendimientos de formación de HCO_3^- y de N_2 . En cambio, los efectos de la AQDS y NQS, se reflejaron en un aumento significativo de las velocidades de consumo de sustrato y formación de productos. No obstante, se presentó una disminución en los rendimientos de formación de N_2 , en presencia de estas dos últimas quinonas.

La NQS, a una concentración de 50 μM , aumentó la velocidad de consumo de sulfuro y el rendimiento de sulfato obtenido con respecto al control sin quinona. En cambio, la AQDS y la lawsona no tuvieron un efecto significativo en los parámetros mencionados. Bajo las mismas condiciones, todas las quinonas promovieron la oxidación completa del sulfuro a sulfato.

Se recomienda un análisis profundo, antes de la toma de decisión, con respecto a la aplicación de una quinona en un proceso desnitrificante. Es importante considerar no sólo el efecto de las mismas sobre las velocidades de consumo de los sustratos, como se presenta en la mayoría de los estudios realizados con quinonas; sino también, su efecto en la ruta metabólica. En efecto, el presente estudio indicó que el producto final del proceso desnitrificante, pudiera ser un intermediario no deseado, como el NO_2^- o el N_2O en presencia tanto de la AQDS como de la NQS. Se sugiere considerar también, la concentración de la quinona que se aplicará en el proceso. Ciertamente, la NQS originó diferentes efectos, al incrementarse 10 veces su concentración, tanto en el cultivo organotrófico con *p*-cresol como fuente de energía, como en los cultivos organolitotróficos (a todas las concentraciones de sulfuro). Esto lleva a sugerir la realización de estudios con aumentos graduales de NQS para identificar el efecto de la concentración de la quinona.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible llevar a cabo la eliminación simultánea de manera eficiente de *p*-cresol, nitrato y sulfuro hasta una concentración de 50 ppm de S^{2-} .

6. REFERENCIAS

- Aneez Ahamad P.Y and Kunhi A.A.M. 1999. Degradation of high concentrations of cresoles by *Pseudomonas* sp CP₄. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 15:321-323.
- APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition. American Public Health Association. Washington D.C.
- Aranda-Tamaura, C., Estrada-Alvarado, M.I., Texier A.-C., Cuervo, F., Gómez, J. and Cervantes F.J. 2007. Effects of different quinoid redox mediators on the removal of sulphide and nitrate via denitrification. *Chemosphere*. 69:1722-1727.
- Atuanya E.I., Purohit, H.J. and Chakrabarti, T. 2000. Anaerobic and aerobic biodegradation of chlorophenols using UASB and ASG bioreactor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 16:95-98
- Beristain Cardoso, Ricardo. 2004. Eliminación anóxica de carbono, nitrógeno y azufre por medio de un reactor de lecho fluidificado inverso. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 79 p.
- Bernet, N., Bizeau, C., Moletta, R., Cornier, J.C. and Deguin, A. 1995. Study of physicochemical factors controlling nitrite build-up during heterotrophic denitrification. *Environmental Technology*. 16:165-172.
- Burland, S.M. and Edwards, E.A. 1999. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(2):529-533.
- Cadena Ramírez, Arturo. 2004. Efecto de las quinonas en la oxidación anaerobia de materia orgánica recalcitrante por un lodo desnitrificante. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 73 p.
- Cardoso, R.B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Razo, F.E., Gómez, J. and Field, J.A. 2006. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(6):1148-1157.
- Carr, G.J., Page, M.D. and Ferguson, S.J. 1989. The energy-conserving nitric-oxide-reductase system in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem*. 179:683-692.
- Cervantes, F., Monroy O. and Gómez J. 1998. Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol. Lett*. 20:959-961.
- Cervantes, F., Monroy O. and Gómez J. 1999. Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 81:13-21.
-

-
- Cervantes-Carrillo F., Pérez, J. y Gómez, J. 2000. Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42:73-82.
- Cervantes, F.J., van der Velde, S., Lettinga, G. and Field, J.A., 2000a. Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:161-171.
- Cervantes, F.J., van der Velde, S., Lettinga, G. and Field, J.A. 2000b. Quinones as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds. *Biodegradation*. 11:313-321.
- Cervantes F.J., De la Rosa, D.A. and Gómez, J. 2001. Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresource Technology*. 79:165-170.
- Cervantes-Carrillo, F.J. 2002. Quinones as electron acceptors and redox mediators for the anaerobic biotransformation of priority pollutants. Thesis Ph. D, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 162 p.
- Cervantes, F.J., de Bok F.A.M., Duong-Dac T., Stams, A.J.M., Lettinga, G. and Field, J.A. 2002. Reduction of humic substances by halo-respiring, sulfate-reducing and methanogenic microorganisms. *Environ. Microbiol.* 4(1):51-57.
- Cervantes, F.J., Vu-Thi-Thu, L., Lettinga, G. and Field, J.A. 2004. Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:702-711.
- Cervantes, F.J., Gutiérrez, C., López, K. Estrada-Alvarado, M.I., Meza-Escalante, E.R., Texier, A.-C., Cuervo, F. and Gómez J. 2008. Contribution of quinone-reducing microorganisms on the anaerobic biodegradation of organic pollutants in the presence of nitrate and sulfate. *Biodegradation*. 19(2):235-246.
- Conrado Moreno-Vivián, Purificación Cabello, Manuel Martínez-Luque, Rafael Blasco and Francisco Castillo. 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases, MINIREVIEW. *Journal of Bacteriology*. 181(21):6573-6584
- Constantin, H. and Fick, M. 1997. Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Wat. Res.* 31(3):583-589.
- Cuervo-López, F.M., Martínez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Noyola, R.A. and Gómez J. 1999. Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci. Technol.* 40(8):123-130.
- Cuervo López, F.M. 2003. Estudio biológico y fisicoquímico de un lodo desnitrificante alimentado con diferentes fuentes de electrones. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 194 p.
-

-
- Curtis, G.P. and Reinhard, M. 1994. Reductive dehalogenation of dehalogenation of hexachloroethane, carbon tetrachloride, and bromoform by anthrahydroquinone disulfonate and humic acid. *Environ. Sci. Technol.* 28:2393-2401.
- Delwiche, C.C. and Bryan, B.A. 1976. Denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.* 30:241-262.
- dos Santos, A.B., Traverse, J., Cervantes, F.J., and van Lier, J.B. 2005. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. *Biotechnology and Bioengineering.* 89(1):42-52.
- Du Guocheng, Geng Jinju, Chen Jian and Lun Shiyi. 2003. Mixed culture of nitrifying bacteria and denitrifying bacteria for simultaneous nitrification and denitrification. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 19:433-437.
- Encinas-Yocupicio, A.A., Razo-Flores, E., Sánchez-Díaz, F., dos Santos, A.B., Field, J.A. and Cervantes, F.J. 2006. Catalytic effects of different redox mediators on the reductive decolorization of azo dyes. *Water Sci. Technol.* 54(2):165-170.
- Fang, H.P. and Zhou Gong-Ming. 1999. Interactions of methanogens and denitrifiers in degradation of phenols. *Journal of Environmental Engineering.* January:57-63.
- Field, J.A., Cervantes, F.J., Van der Zee, F. and Lettinga, G. 2000. Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Water Sci. Technol.* 42 (5-6): 215-222.
- Field J.A. and Cervantes F.J. 2005. Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. In: Perminova IV, Hatfield K, Hertkorn N (eds) Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: from Theory to Practice.
- Gommers, P.J., Buleveld, W., Zuiderwijk, F.J. and Kuenen, J.G. 1998. Simultaneous sulphide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Water Res.* 22:1075-1083.
- Guerrero Baquedano, Fernanda A. 2007. Eliminación simultánea de p-cresol, nitrato y sulfuro por desnitrificación litotrófica-organotrófica. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 77 p.
- Hägglom, M.M., Rivera, M.D., Bossert, I.D., Rogers, J.E. and Young, L.Y. 1990. Anaerobic biodegradation of *para*-cresol under three reducing conditions. *Microb. Ecol.* 20:141-150.
- Häner, A., Höhener, P. and Zeyer, J. 1995. Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology.* 61 (8): 3185-3188
- Heesche-Wagner, K., Schwarz, T. and Kaufmann, M. 1999. Phenol degradation by an enterobacterium: a *Klebsiella* strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase. *Can. J. Microbiol.* 45:162-171.
-

-
- Heider, Johann and Fuchs, Georg. 1997. Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe*. 3:1-22.
- Islas Lima, Sandra. 2004. Desnitrificación de aguas residuales utilizando metano como única fuente de carbono. Tesis doctoral. CINVESTAV. México, D.F. 101 p.
- Janssen, Albert J.H. 1996. Formation and colloidal behaviour of elemental sulphur produced from the biological oxidation of hydrogensulphide. Thesis Ph. D, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 121 p.
- Jetten, Mike S.M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L.A., de Vries, S., van Loosdrecht, Mark C.M. & Kuenen, G. 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenbock*. 71:75-93.
- Kappler, A., Benz, M., Schink, B. and Brune, A. 2004. Electron shuttling via humic acids in microbial iron (III) reduction in a freshwater sediment. *Microbiology Ecology*. 47:85-92.
- Kemmer, Frank y McCallion, John. 1998. MANUAL DEL AGUA. Su naturaleza, tratamiento y aplicaciones. Tercera edición. McGraw Hill. Colombia.
- Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microb. Rev.* 46:43-69.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W. and Klapwijk, A. 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22:699-734.
- Lovley, D.R. and Blunt-Harris, E. 1999. Role of humic-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe (III) reduction. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9):4252-4254.
- Lovley, D., Fraga, J.L., Coates, John D. and Blunt-Harris, E.L. 1999. Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environmental Microbiology*. 1(1):89-98.
- Madigan Michael T., Martinko John M., Parker Jack. 2001. Brock. Biología de los microorganismos. Octava edición. Editorial Prentice Hall. España.
- Manconi, L., Carucci, A., Lens, P. and Rosseti, S. 2006. Simultaneous biological removal of sulphide and nitrate by autotrophic denitrification in an activated sludge system. *Water Sci. Technol.* 53(12):91-99.
- Mateju, V., Cizinská, S., Krejeí, J. and Janoch, T. 1992. Biological water denitrification- A review. *Enzyme Microb. Technol.* 14:170-183.
- Meza-Escalante, E.R., Texier, A.-C., Cuervo-López, F., Gómez, J. and Cervantes, F.J. 2008. Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and *p*-cresol by denitrifying sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83(3):372-377.
-

- Olmos, A., Olguin, P., Fajardo, C., Razo, E. and Monroy, O. 2004. Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour water from mexican oil refineries. *Energy & Fuels*. 18:302-304.
- Park, J.-H., Shin, H.-S., Lee, I.-S. and Bae, J.-H. 2002. Denitrification of high NO_3^- -N containing wastewater using elemental sulphur; nitrogen loading rate and N_2O production. *Environmental Technology*. 23:53-65.
- Peña-Calva A., Olmos-Dichara A., Viniestra-González G., Cuervo-López F.M. and Gómez J. 2004. Denitrification in presence of benzene, toluene and m-xilene. Kinetics, mass balance and yields. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 119:195-208.
- Pérez Trevilla, Jaime. 1998. Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 113 p.
- Perlinger, J.A., Buschmann, J., Angst, W. and Schwarzenbach, R.P. 1998. Iron porphyrin and mercaptojuglone mediated reduction of polyhalogenated methanes and ethanes in homogeneous aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 32:2431-2434.
- Perlinger, J.A., Angst, W. and Schwarzenbach, R.P. 1996. Kinetics of the reduction of hexachloroethane by juglone in solutions containing hydrogen sulfide. *Environ. Sci. Technol.* 30:3408-3417.
- Prescott Lansing M., Harley John P. Klein Donald A. 1999. Microbiología. Cuarta edición. Mc Graw Hill-Interamericana. España.
- Puig-Grajales, L., Rodríguez-Nava, O. and Razo-Flores, E. 2003. Simultaneous biodegradation of a phenol and 3,4-dimethylphenol mixture under denitrifying conditions. *Water Science and Technology*. 48(6):171-178.
- Rau, J., Knackmuss, H.-J. and Stolz, A. 2002. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 36:1497-1504.
- Razo-Flores, E., Iniestra-González, M., Field, J.A., Olguín-Lora, P. and Puig-Grajales, L. 2003. Biodegradation of mixtures of phenolic compounds in an upward-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Environmental Engineering*. November: 999-1006.
- Reyes Avila, Jesús. 2000. Eliminación biológica simultánea de nitrógeno, carbono y azufre por desnitrificación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 89 p.
- Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E. and Gómez, J. 2004. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*. 38:3313-3321.
- Richardson, David J. and Watmough, Nicholas J.. 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*. 3:207-219.

-
- Richardson David J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*. 146:551-571.
- Rustrian, E., Delgenes, J.P., Bernet, N. and Moletta, R. 1997. Nitrate reduction in acidogenic reactor: Influence of wastewater COD/N-NO₃ ratio on denitrification and acidogenic activity. *Environmental Technology*. 18:309-315.
- Schönharting, B., Rehner, R., Metzger, J., Krauth, K. and Rizzi, M. 1998. Release of nitrous oxide (N₂O) from denitrifying activated sludge caused by H₂S-containing wastewater: quantification and application of a new mathematical model. *Water Sci. Technol.* 38(1):237-246.
- Shibata, Hiroomi and Kobayashi, Shigeki. 2001. Sulfide oxidation in gram-negative bacteria by expression of the sulfide-quinone reductase gene of *Rhodobacter capsulatus* and by electron transport to ubiquinone. *Can. J. Microbiol.* 47:855-860.
- Sierra-Alvarez, R., Guerrero, F., Rowlette, P., Freeman, S. and Field, J.A. 2005. Comparison of chemo-, hetero- and mixotrophic denitrification in laboratory-scale UASBs. *Water Science and Technology*. 52(1-2):337-342.
- Sierra-Alvarez, R., Beristain-Cardoso, R., Fernández, N., Gómez, J., Razo-Flores, E. and Field, J.A. 2007. Chemolithotrophic denitrification with elemental sulphur for groundwater treatment. *Water Research*. 41:1253-1262.
- Smil, V. 1997. Global population and the nitrogen cycle. *Scientific American*. 277(1): 76-81.
- Sørensen, J., Tiedje, J.M. and Firestone, R. 1980. Inhibition by Sulfide of Nitric and Nitrous Oxide Reduction by Denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(1):105-108.
- Speece, R.E. 1996. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater. Archaea Press, Nashville, Tennessee.
- Strand Stuart. 200X. Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds –Ring Cleavage without Oxygen-. Pag:1-18.
- Telang, A.J, Jenneman, G.E. and Voordouw, G. 1999. Sulfur cycling in mixed cultures of sulphide-oxidizing and sulphate-or-sulfur-reducing oil field bacteria. *Can. J. Microbiol.* 45:905-913.
- Thomas, S., Sarfaraz, S., Mishra, L.C. and Iyengar, L. 2002. Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18:57-63.
- Trouve, C., Chazal, P.M., Gueroux, B. and Sauvaitre, N. 1998. Denitrification by news strains of *Thiobacillus denitrificans* under non-standard physicochemical conditions. Effect of temperature, pH, and sulphur source. *Environ. Technol.* 19:601-610.
-

- Tugtas A. E. and Pavlostathis S. G. 2007. Effect of sulfide on nitrate reduction in mixed methanogenic cultures. *Biotechnol Bioeng.* 97:1448-1459.
- Vaiopoulou E., Melidis P. and Aivasidis A. 2005. Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification. *Water Res.* 39:4101-4109.
- Visser, André. 1995. The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Thesis Ph. D, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 145 p.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M. 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science.* 5325:494-499.
- Wicht, H. 1996. A model for predicting nitrous oxide production during denitrification in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 34(5-6):99-106.
- Zumft, Walter G. 1997. Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 61(4):533-616.

ANEXOS

A.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS.

Descripción de los métodos analíticos utilizados y curvas estándares que muestran la reproducibilidad de los mismos.

A.1.1 Cuantificación de NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.

Estos iones se cuantificaron primeramente por electroforesis capilar en un analizador capilar de iones (CIA, Prince Technologies CE 221, versión de software 1.1). El capilar que se empleó fue una columna de sílice fundida de 80 cm de largo y 75 μm de diámetro interno. Se utilizó una corriente de 10 μA y un voltaje negativo de 20 kV. Las inyecciones se realizaron por presión a 30 mbars por 0.1 min. El tiempo de corrida suficiente para cuantificar estos iones fue de 6.50 min con 2 minutos de purga entre cada muestra. La detección se realizó con una lámpara ultravioleta (Bischoff, modelo Lambda 1010) a 254 nm. El método se basa en la migración electroforética de iones al aplicar un voltaje a través de un capilar, causando una migración diferencial de los componentes de la muestra “cargada” eléctricamente hacia el electrodo respectivo. Dependiendo de la polaridad de la energía suministrada y la composición del electrolito, el analito pasa a través del detector (Reyes, 2004).

Procedimiento: Se prepara el electrolito de trabajo que consiste en 4.6 mL de solución OFM Anion-BT (Waters) y 9.2 mL de cromato concentrado (4.2 mM) aforados a 200 mL con agua desionizada.

El electrolito, la solución estándar de concentración conocida y las muestras a analizar, se filtran con una membrana de nylon de 0.45 μm . De ser necesario, se realizan diluciones en la solución estándar y en las muestras para no tener concentraciones arriba de los 50 mg/L del ion a analizar.

Se evaluó el comportamiento de respuesta y el grado de reproducibilidad del método al tener mezclados los 4 iones. La figura A.1 (a y b) muestra las curvas estándares promedio de 3 curvas realizadas con una solución de NaNO_3 y NaNO_2 a un intervalo de 1 a 50 mg NO_3^-/L y NO_2^-/L , obteniendo un coeficiente de variación del valor de la pendiente promedio de 7.7% para nitrato y 5.6 % para nitrito.

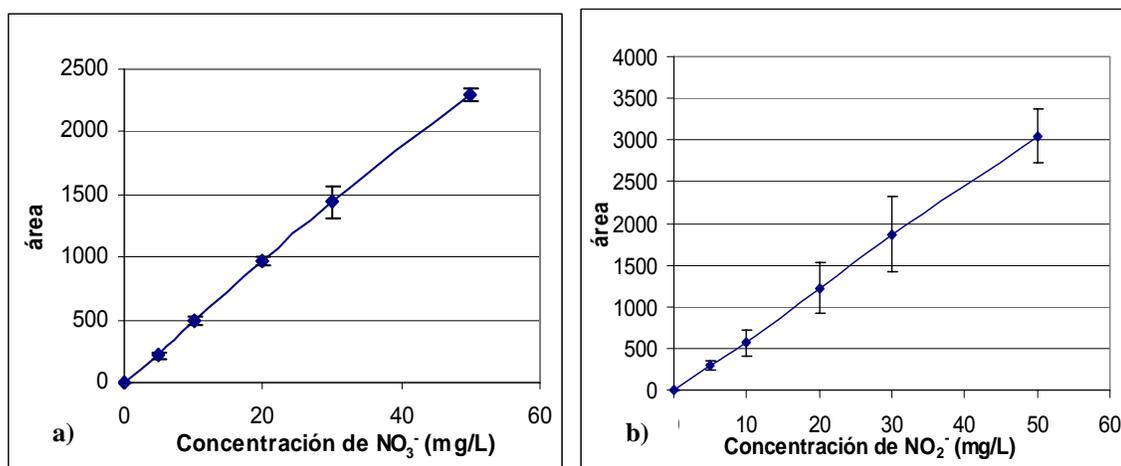


Figura A.1. Curvas estándares por electroforesis: a) nitrato y b) nitrito.

Con respecto a los iones sulfato y tiosulfato, se obtuvieron los valores mostrados en la figura A.2 (a y b). Igual que para los otros iones, se muestra la curva estándar promedio de 3 curvas estándar realizadas con una solución de Na₂SO₄ y Na₂S₂O₃ a un intervalo de 1 a 50 mg SO₄²⁻/L y S₂O₃²⁻/L, obteniéndose un coeficiente de variación del valor de la pendiente promedio de 10 % para sulfato y 5.5 % para tiosulfato.

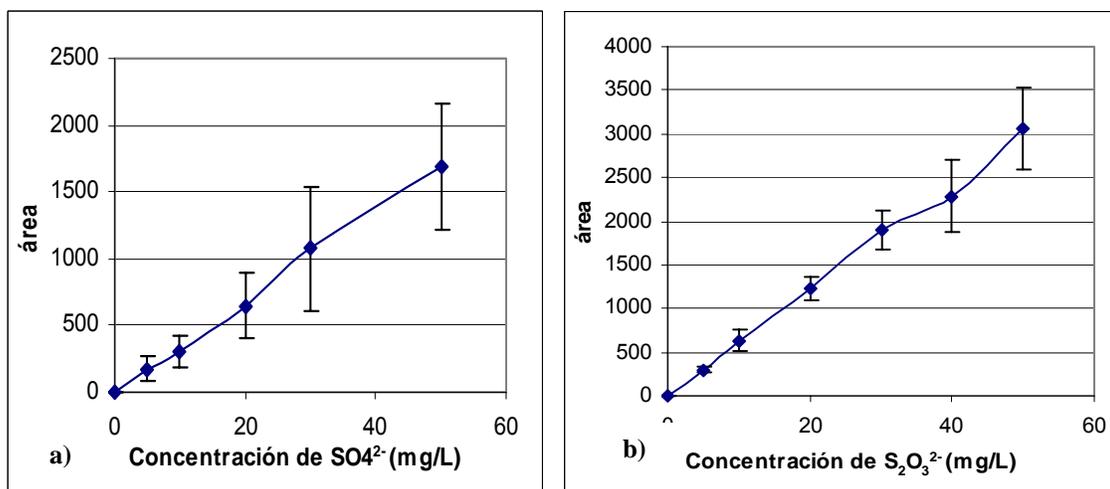
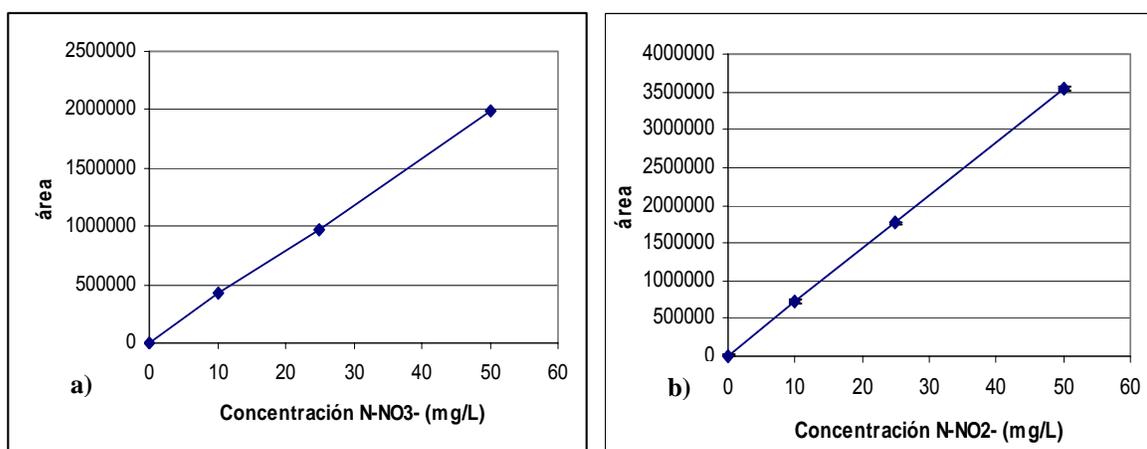


Figura A.2. Curvas estándares por electroforesis: a) sulfato y b) tiosulfato.

La concentración del ion analizado se determina por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (ppm) del compuesto} = \frac{(\text{ppm estándar del compuesto}) (\text{área de la muestra})}{\text{área estándar del compuesto}}$$

La medición de estos iones se realizó también por cromatografía de líquidos, como método alternativo. NO_3^- y NO_2^- se determinaron usando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, Perkin Elmer serie 200) y un detector UV visible a 254 nm. El SO_4^{2-} se determinó en un HPLC equipado con un detector de arreglo de diodos por conductividad (Waters 432). En ambos equipos se utilizó una columna de intercambio iónico (IC-Pak A HC Waters 4.6 x 75 mm). La fase móvil fue una mezcla de butanol, acetonitrilo y una solución concentrada de borato-gluconato (20:120:20 v:v:v) aforados a 1 L con agua desionizada. La composición del concentrado de borato-gluconato fue (g/L): ácido bórico (18), gluconato de sodio (16) y tetraborato de sodio decahidratado (25). El flujo fue de 2 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 μL . De la misma manera que en el método de electroforesis, se construyó una curva estándar por triplicado y se encontró respuesta lineal (Figura A.3), con un coeficiente de variación del valor de la pendiente de 1.9 % para nitrato y 1.2 % para nitrito.



Con respecto al método alternativo para la medición de SO_4^{2-} , se obtuvo la curva estándar promedio representada en la figura A.4. El coeficiente de variación para la pendiente promedio fue del 2.2%.

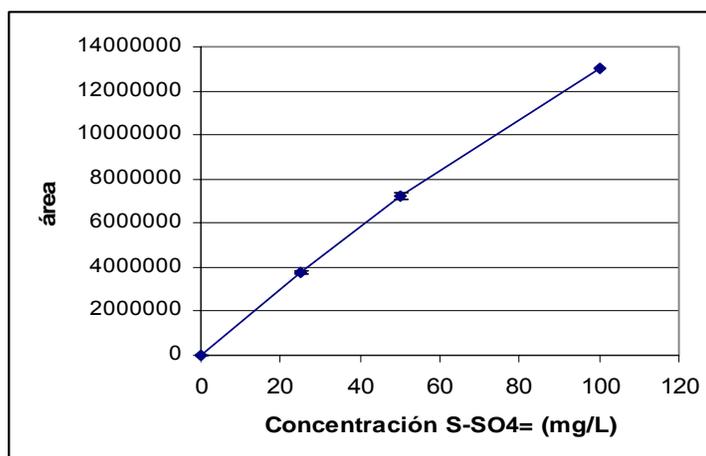


Figura A.4. Curva estándar por HPLC de sulfato.

En el caso del método alternativo para la medición de $S_2O_3^{2-}$ se realizó con HPLC (Perkin Elmer serie 200) y un detector UV visible a 210 nm. Se utilizó una columna C-18 fase reversa. La fase móvil fue una mezcla de un buffer de fosfatos (50 mM) y acetonitrilo (90:10 v:v). El buffer de fosfatos tuvo la siguiente composición (g/L): 0.0013 K_2HPO_4 , 6.8 KH_2PO_4 y se ajustó el pH a 3 con ácido fosfórico. El flujo fue de 1.2 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 μ L.

A.1.2 Amonio.

Se utilizó un electrodo selectivo del ion amoniaco (Phoenix Electrode Co.). El ion amonio es transformado a amoniaco por la alcalinización de las muestras con NaOH. El amoniaco pasa a través de una membrana permeable al gas ubicada en el fondo del electrodo, el cual se coloca con una inclinación de 45° para evitar la formación de burbujas. La medición del potencial redox se realizó con un potenciómetro Cole-Parmer bajo agitación constante a temperatura ambiente.

Procedimiento: Se toma un volumen de 50 mL de muestra y se agrega 0.5 mL de NaOH 10N manteniendo una agitación constante de la muestra, se registra el valor en mV del potenciómetro cuando el valor permanece constante. Las mediciones deben realizarse de manera inmediata después de la adición del NaOH para evitar pérdidas de amoniaco por arrastre.

La Figura A.5 muestra la curva estándar promedio realizadas por triplicado con una solución de NH_4Cl a un intervalo de 1 a 100 mg NH_4/L , obteniendo un coeficiente de variación del 11% y un coeficiente de correlación > 0.98 .

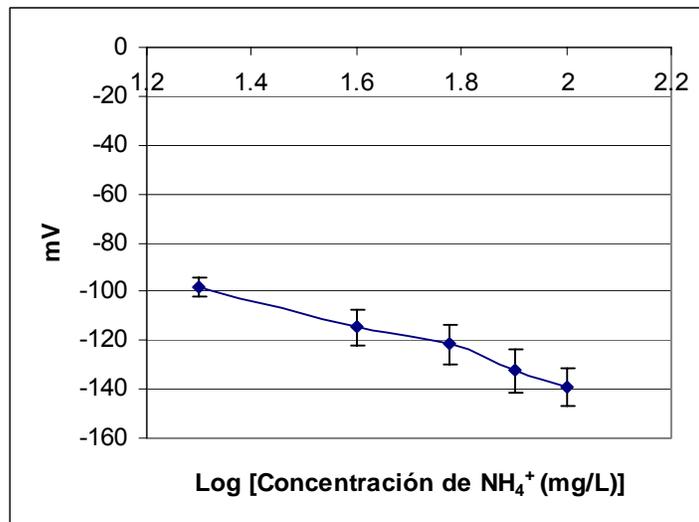


Figura A.5. Curva de calibración con concentraciones estándares de amonio.

A.1.3 Carbono orgánico e inorgánico.

Estos compuestos carbonados se cuantificaron en un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu, TOC-5000). Este equipo cuenta con un tubo de combustión para carbón total que contiene catalizador para la combustión y es calentado a 680°C. Utiliza aire de alta pureza como gas de arrastre. El principio de medición se basa en la propiedad de absorción de radiación infrarroja que presentan moléculas poliatómicas de gas como el CO_2 y CH_4 , a diferencia de moléculas monoatómicas como N_2 , O_2 y H_2 que no presentan esa propiedad. Los productos de la combustión pasan por un analizador de gas infrarrojo en donde es detectado el CO_2 arrojando un área calculada por un procesador, la cual está relacionada con la concentración de carbono en la muestra. Esta concentración se determina con base en una curva de calibración elaborada anteriormente.

En la tabla A.4 se muestran los valores de las pendientes (m) y ordenadas al origen (b) promedio obtenidas para 3 curvas estándar de carbono total hasta una concentración de 500 mg/L.

Tabla A.4. Datos obtenidos durante la curva de calibración de carbono orgánico total (500 mg/L).

	m	B	r²
curva 1	69.43	147.90	0.999
curva 2	69.16	117.53	0.999
curva 3	69.37	111.39	0.999
Promedio	69.32	125.61	
Desv. Estándar	0.14	19.55	
Coef. de variación (CV, %)	0.21	15.56	

La tabla A.5 muestra los valores de las pendientes y ordenadas al origen promedio obtenidas para tres curvas estándar de carbono inorgánico hasta una concentración de 500 mg/L.

Tabla A.5. Datos obtenidos durante la curva de calibración de Carbono inorgánico (500 mg/L).

	m	b	r²
curva 1	84.03	469.66	0.999
curva 2	81.92	184.24	0.999
curva 3	90.95	157.12	0.999
Promedio	85.64	270.34	
Desv. Estándar	4.72	173.15	
CV (%)	5.52	64.05	

A.1.4 Acetato.

La medición de acetato se realizó en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890) con un detector de ionización de flama (FID), y una columna AT 1000 de 10 m y 0.53 mm de diámetro. El gas acarreador es nitrógeno a 6.6 mL/min. La fase estacionaria fue de ácidos modificados de polietinglicol. Las condiciones de operación del equipo son: temperatura del inyector de 130 °C, detector a 150 °C, tiempo de corrida de cada muestra es de 4.7 min y el volumen de inyección de 0.5 µL.

Procedimiento: De ser necesario se realizan las diluciones adecuadas, se toma 0.95 ml de la muestra y 0.05 ml de HCl al 50 % ya que el equipo detecta ácido acético.

El equipo cuenta con un sistema de adquisición de datos (HP software 3398 A), arrojando valores de áreas, las cuales son proporcionales a la concentración del componente a analizar. La tabla A.6 muestra las áreas promedios, desviación estándar y los coeficientes de variación de valores obtenidos en 4 curvas estándar con concentraciones de 0 a 500 mg C-acetato /L.

Tabla A.6. Áreas promedio, desviación estándar y coeficiente de variación obtenidos en la medición de C-acetato.

Concentración (mg/L)	Áreas promedio	Desviación estándar	CV (%)
0	0	0	0
50	60445.25	1112.77	1.84
100	116200.33	1588.65	1.37
200	231307.25	4877.93	2.11
300	346157.50	6883.56	1.99
400	455541.67	11549.44	2.54
500	568886.75	10271.03	1.81

La figura A.6 muestra la curva estándar promedio de 4 curvas realizadas con una solución de acetato de sodio a un intervalo de 1 a 500 mg C-acetato/L.

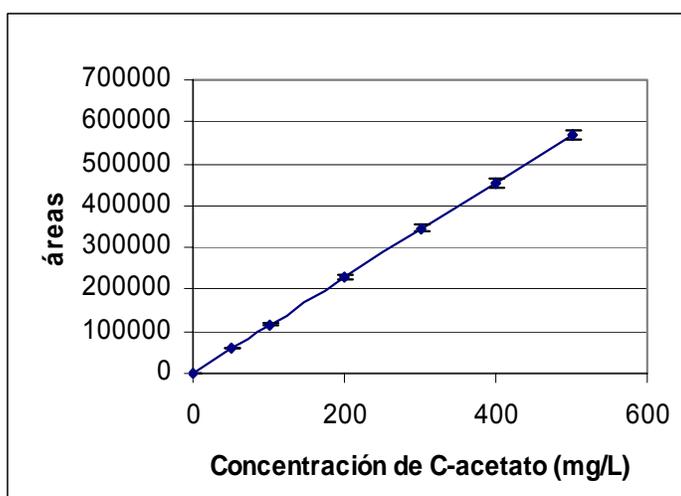


Figura A.6. Curva de calibración con concentraciones estándares de acetato.

A.1.5 *p*-cresol.

La cuantificación de *p*-cresol se realizó en un equipo de HPLC que incluía una bomba Waters 600 y un detector de arreglo de diodos Waters 2996. La fase móvil fue acetonitrilo-agua 60:40 (v:v). Se utilizó una columna C-18 fase reversa y un detector UV visible a 280 nm. El volumen de inyección fue de 20 μ L y el flujo de 1.5 mL/min. El equipo cuenta con un sistema de adquisición de datos (marca Empower) arrojando valores de áreas las cuales son proporcionales a la concentración del componente a analizar.

La tabla A.7 muestra las áreas promedio, desviación estándar y los coeficientes de variación (en porcentaje) de valores obtenidos en 3 curvas estándar hasta una concentración de 50 mg de *p*-cresol /L.

Tabla A.7. Áreas promedio, desviación estándar y coeficiente de variación obtenidos en la medición de *p*-cresol por HPLC.

Concentración (mg/L)	Áreas promedio	Desviación estándar	CV (%)
0	0	0	0
5	11192.33	424.56	3.79
10	22688.33	221.57	0.98
20	42664.67	1381.46	3.24
30	67322.67	2653.07	3.94
40	85581.00	2832.75	3.31
50	105814.00	4523.87	4.28

La figura A.7 muestra la pendiente y ordenada en el origen promedias de 3 curvas estándar realizadas hasta una concentración de 50 mg *p*-cresol/L.

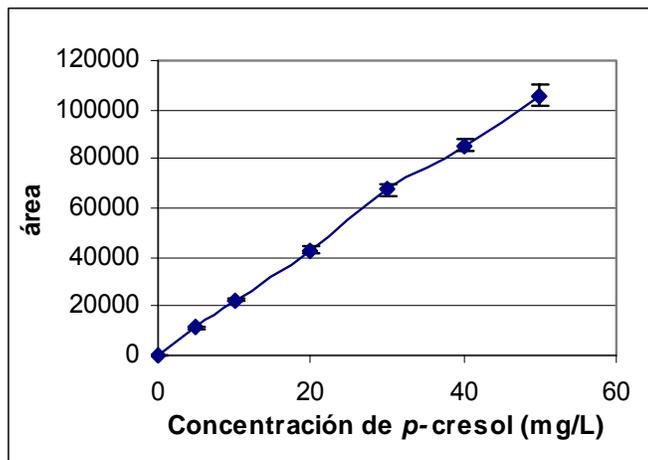


Figura A.7. Curva de calibración con concentraciones estándares de *p*-cresol.

Se empleó también un método alternativo para la cuantificación de *p*-cresol y sus intermediarios aromáticos, presentándose en nuestros experimentos el *p*-hidroxi benzoato. Esta medición se realizó también en HPLC (Waters) con detector de arreglo de diodos, sólo que la fase móvil utilizada para esta medición fue acetato-acetonitrilo 70:30 (v:v), la cual nos permitió una mejor identificación del intermediario aromático de la ruta de oxidación del *p*-cresol. La solución de acetato utilizada para la fase móvil fue al 50 mM y un pH de 4.6, el cual se ajustó con HCl. Se utilizó la misma columna C-18 fase reversa a un flujo de 1.2 mL/min. El volumen de inyección y la longitud de onda con las que se trabajaron fueron iguales al método anterior (20 μ L, 280 nm).

La figura A.8 muestra la curva estándar promedio de 5 curvas realizadas con soluciones de *p*-cresol y *p*-OH benzoato de sodio a un intervalo de 1 a 50 mg carbono del compuesto/L. El coeficiente de variación, en porcentaje, fue de 2.9 para el *p*-OH benzoato y de 5.7 para el *p*-cresol.

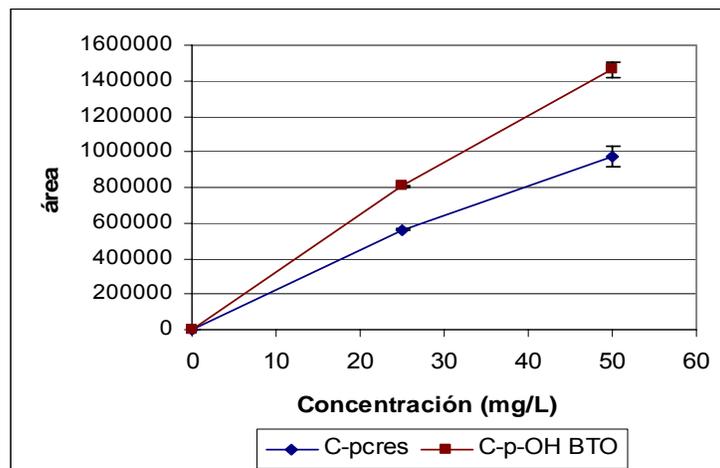


Figura A.8. Curva de calibración con concentraciones estándar de C-*p*-cresol.

A.1.6 Sulfuro.

Para la cuantificación del sulfuro se utilizó el método yodométrico, el cual se basa en la capacidad oxidante débil del yodo frente a un reductor fuerte como es el ion sulfuro, en medio ácido. La medición se hace en forma indirecta por una valoración en retroceso del yodo remanente empleando una solución estándar de tiosulfato de sodio.

Procedimiento: Adicionar en un matraz Erlenmeyer, 5 mL de solución de yodo 0.025 N, 10 mL de agua destilada y 1 mL de HCl 3N sin agitar. Añadir 10 mL de la muestra problema y dejar en reposo por 10 min. Titular lentamente con una solución de tiosulfato de sodio al 0.025 N, al momento en que el contenido del matraz tome una coloración amarilla, adicionar indicador de almidón con lo que la coloración se tornará de color oscura. Continuar con la titulación con la solución de tiosulfato hasta que esta coloración oscura cambie a incolora (APHA, 1998).

El cálculo de la cantidad de sulfuro se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg S}^{2-}}{\text{L}} = \frac{[(A \times B) - (C \times D)] \times 16000}{\text{volumen de muestra (mL)}}$$

Donde:

A= volumen de solución de yodo, mL

B= Normalidad de la solución de yodo

C= volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, mL

D= Normalidad de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Para verificar la reproducibilidad del método, se preparó una solución estándar y se realizaron mediciones por triplicado de varias concentraciones de sulfuro, en un intervalo de 0 a 300 mg de S^{2-}/L . La reproducibilidad del método fue mayor del 94%.

A.1.7 Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles.

Este parámetro se determinó por el método estándar. Procedimiento: Se depositan 10 ml de muestras homogéneas (V) de lodo en un crisol puesto previamente a peso constante del cual ya se obtuvo su peso (A). La humedad contenida en el lodo se evapora en una parrilla a baja temperatura y se llevan los crisoles a una estufa por una hora a una temperatura de 105 °C, de ahí se lleva al desecador para obtener después su peso (B) y el contenido de sólidos suspendidos totales. Por último, se llevan a una mufla a 550 °C por 45 min y después de enfriar se pesan (C) para obtener los sólidos suspendidos fijos (APHA, 1998).

La concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos fijos (SSF) en g/L se calculan por las siguientes fórmulas:

$$\text{g SST/ L} = (B-A) / V$$

$$\text{g SSF/ L} = (C-A) / V$$

La diferencia de estos parámetros es la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV):

$$\text{g SSV/ L} = \text{SST} - \text{SSF}$$

La velocidad volumétrica de C y N en la biomasa fue determinada de forma indirecta con la medición del incremento de SSV presentada durante el tiempo que fue monitoreado el reactor. Se consideró que aproximadamente el 50% del material celular de las bacterias es conformada por carbono.

A.1.8 Cuantificación de gases: N_2 , N_2O .

El nitrógeno molecular (N_2) y el óxido nitroso fueron analizados por cromatografía de gases (Varian 3350) con un detector de conductividad térmica (TCD), la fase móvil utilizada fue helio (4.8 Praxair) a un flujo de 16 mL/min (Schomburg, 1990). Las condiciones de

temperatura fueron: columna, 35 °C; inyector, 100 °C y detector, 110 °C. El volumen de inyección fue de 100 μ L.

La Figura A.9 presenta la curva estándar promedio realizada por triplicado de nitrógeno molecular, obteniendo un coeficiente de variación del valor de la pendiente promedio de 1.1 %.

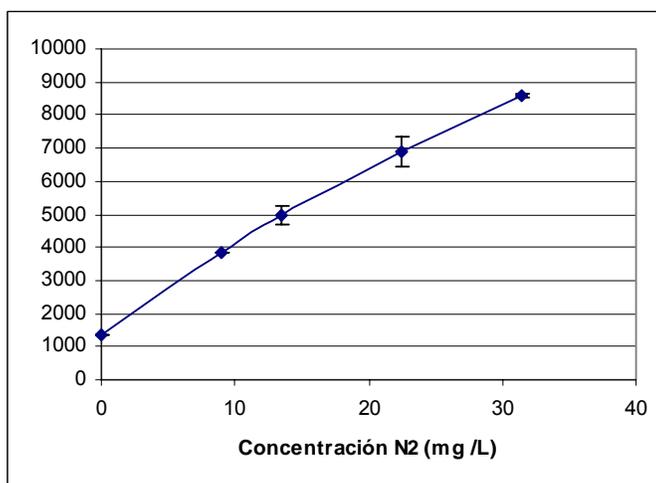


Figura A.9. Curva de calibración con concentraciones estándares de nitrógeno molecular.

La muestra del biogás producido se obtuvo tomando una muestra con una jeringa en la línea de recolección del biogás en el caso del reactor, y en el espacio de cabeza a través del septo colocado en las botellas, en el caso de los cultivos en lote. Se realizaron directamente inyecciones por duplicado al cromatógrafo de cada muestra.

Para el resto de los compuestos gaseosos, sólo se realizó su identificación por cromatografía pero su cuantificación se realizó por balance de los compuestos nitrogenados.

A.2 Publicación relacionada con la Tesis.

Meza-Escalante, E.R., Texier, A.-C., Cuervo-López, F., Gómez, J. and Cervantes, F.J. 2008. Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and *p*-cresol by denitrifying sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **83**(3):372-377.

Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and *p*-cresol by a denitrifying sludge

Edna R Meza-Escalante,¹ Anne-Claire Texier,¹ Flor Cuervo-López,¹ Jorge Gómez¹ and Francisco J Cervantes^{2,3,*}

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Iztapalapa, D.F., 09340 México.

²Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente, Instituto Tecnológico de Sonora. Av. 5 de febrero 818 sur. Cd. Obregón, Sonora, 85000 México.

³División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4^a Sección, San Luis Potosí, SLP, 78216 México.

* Corresponding author, Present address: División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4^a Sección, San Luis Potosí, SLP, 78216 México. Phone: (52) 444 8342026; Fax: (52) 444 8342010. E-mail: fjcervantes@ipicyt.edu.mx

Abstract:

BACKGROUND: Many industrial discharges, such as those generated from petrochemical refineries, contain large amounts of sulphurous, nitrogenous and organic contaminants. Denitrification has emerged as a suitable technology for the simultaneous removal of these pollutants in a single reactor unit; however, more evidence is demanded to clarify the limitations of denitrification on the simultaneous removal of sulphide and phenolic contaminants and to optimise the biological process. The aim of this study was to evaluate the capacity of a denitrifying sludge to simultaneously convert sulphide and *p*-cresol via denitrification.

RESULTS: Sulphide was the preferred electron donor over *p*-cresol imposing a 5-h lag phase (required for complete sulphide removal) on organotrophic denitrification. Addition of sulphide (20 mg S²⁻/L) to *p*-cresol amended denitrifying cultures also decreased the reduction rate of nitrate and nitrite, as well as the production rate of nitrogen gas. Nitrite reduction rate was the most affected step by sulphide decreasing from 21 to 11 mg N [g VSS.d]⁻¹. A synergistic inhibitory effect of nitrate and sulphide was also observed on nitrite reduction. Despite the effects of sulphide on the respiratory rates monitored, complete removal of nitrate, sulphide and *p*-cresol could be achieved after 48 hours of incubation.

CONCLUSION: Our results suggest that simultaneous removal of sulphide and *p*-cresol could be achieved in denitrifying reactors, but a large hydraulic residence time may be required to sustain an efficient process due to inhibitory effects of sulphide.

Keywords: denitrification; inhibition; *p*-cresol; sulphide; wastewater

INTRODUCTION

Many industrial effluents, such as those generated from petrochemical refineries, paper mills and tanneries, contain in addition to hydrocarbons, large amounts of nitrogen and sulphur,¹⁻³ which demand suitable technologies to achieve simultaneous removal of these contaminants.^{4,5}

Treatment technologies for the simultaneous removal of carbon, nitrogen and sulphur under anoxic conditions have recently received considerable attention due to advantages such as cost and space decrease and also because the contamination of water bodies by these pollutants may cause problems to ecosystems and to public health.^{2,4,6,7}

Nitrate is either released by industrial and agricultural activities or produced in wastewater treatment facilities through oxidation of ammonia via nitrification. Nitrate removal from wastewaters can be achieved by different technological approaches including biological denitrification, which has been shown as a competent and cost-effective method.^{8,9} This respiratory process can proceed under lithotrophic conditions using elemental sulphur, sulphide, pyrite, and thiosulphate as an electron donor.^{2-5,8,10,11} Denitrification can also be linked to the oxidation of a wide variety of organic compounds including volatile fatty acids, alcohols and phenolic compounds.^{4,12,13}

Complete denitrification involves four enzymatic steps in stepwise manner in which nitrate is reduced to nitrite, nitric oxide, nitrous oxide, and nitrogen gas. Dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA) can also occur in denitrifying consortia leading to the production of ammonia.⁹

In a search of factors that affect the overall activity and the accumulation of denitrification intermediates, most references focus on operational parameters such as O₂, available carbon, C/N ratio, hydraulic retention time (HRT), pH and temperature.¹⁴⁻¹⁶ Much less attention has been paid to the effects imposed by sulphide and other inhibitory compounds and to the role of trace metals demanded as cofactors (molybdenum, iron and copper) by the enzymes involved in denitrification.^{5, 17-19} Sulphide is a very toxic compound for many different microorganisms, even at concentrations as low as 10 mg/L, but the inhibitory sulphide levels highly depend on the microbial species, pH, temperature, and the type of substrate supplied.^{7,20} Moreover, the literature does not provide conclusive evidence on which denitrifying step is the most vulnerable to the inhibitory effects of sulphide. Several studies, for instance, described an inhibitory effect of sulphide on the last steps of denitrification consequently causing release of N₂O or NO from the microbial incubations.^{4,17,21,22} Dalsgaard and Bak²³ reported inhibition on nitrate reduction (from 37 to 71% compared to the control without sulphide) in a wide range of sulphide concentrations (46 to 152 µM). Several studies, in contrast, report accumulation of only nitrite at different sulphide concentrations.^{2,8,11}

Thus, kinetic parameters available in the literature do not reveal clear limitations of the applicability of denitrification for the simultaneous removal of sulphide and organic compounds. Furthermore, inhibitory effects of sulphide on the simultaneous removal of sulphide and *p*-cresol has not been previously reported and the study is especially required as many industrial effluents are contaminated with nitrogen, sulphur and phenolic compounds.^{4,24} The aim of this research was to quantify the inhibitory effects of sulphide on organotrophic denitrification using *p*-cresol as electron donor.

MATERIALS AND METHODS

Biomass stabilization in a denitrifying reactor

A 1.4 L upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor was operated at 30 °C and with a HRT of 2 days to obtain a denitrifying consortium under steady state conditions. The reactor was inoculated with 6 g volatile suspended solids (VSS) L⁻¹ of denitrifying sludge previously fed with acetate as electron donor. The synthetic influent was divided into two parts (source of carbon and source of nitrogen) in order to preserve it and to avoid precipitation of metals. The two influent parts were initially pumped separately by a peristaltic pump and combined just before entering the reactor.

The composition of the carbon source medium was (g L^{-1}): *p*-cresol (0.319), acetate (0.305), KH_2PO_4 (1.2), K_2HPO_4 (3.2), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.4). Meanwhile, the composition of the nitrogen source medium was (g L^{-1}): NaNO_3 (1.716), Na_2SO_4 (1) and trace element solution (2 mL L^{-1}). The trace element solution consisted of (g L^{-1}): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.6), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.12), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.03), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.02). The C/N ratio of the influent was adjusted to 1.13.

Nitrate, nitrite, acetate, *p*-cresol and its aromatic intermediates, *p*-hydroxy-benzyl alcohol, *p*-hydroxy-benzaldehyde and *p*-hydroxy-benzoate, were quantified in the denitrifying reactor. Biogas production and composition were also regularly monitored in the reactor.

Table 1 summarises the reactor performance under steady state conditions. Both *p*-cresol and acetate were totally removed and the main carbonaceous product was bicarbonate with a yield ($Y_{\text{HCO}_3^-}$) of 0.66 ± 0.04 . Nitrate removal efficiency was $99.5 \pm 0.2\%$ and a high production yield of molecular nitrogen ($Y_{\text{N}_2} = 0.88 \pm 0.04$) was observed. Ammonia formation via DNRA was not detected in the denitrifying reactor.

Table 1 Performance of the UASB denitrifying reactor under steady state conditions ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)

TOC_{in}	85.4 ± 1.2
TIC_{out}	56.7 ± 3.7
C-biomass	12.6 ± 1.9
TOC_{out}	7.2 ± 0.8
NO₃⁻-N_{in}	75.5 ± 0.44
NO₃⁻-N_{out}	0.4 ± 0.1
NO₂⁻-N_{out}	1.0 ± 0.3
N₂ produced	65.8 ± 3.1
N-biomass	2.5 ± 0.4

^a Data represent mean values obtained from 63 days of steady-state denitrifying conditions \pm standard deviation.

^b Represents the sum of dissolved TIC and C-CO₂ measured in the headspace.

^c TOCout constituted by unidentified compounds (no acetate and *p*-cresol detected). TOC, total organic carbon; TIC, total inorganic carbon.

Batch assays

Batch experiments were undertaken in serologic bottles of 160 mL. Sludge incubations contained 60 mL of basal medium and were inoculated with the previously stabilized denitrifying sludge (1 g VSS L^{-1}). The basal medium consisted of (g L^{-1}): KH_2PO_4 (0.6), K_2HPO_4 (1.6), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2) and trace element solution (2 mL L^{-1}) with the composition described above. The pH of the basal medium was adjusted to 7. The cultures were supplied with stoichiometric concentrations of the electron donor and electron accepting substrate, resulting in a total C and N concentration of $44 \text{ mg C-}p\text{-cresol L}^{-1}$ and $50 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ (C/N ratio of 0.88). Serum bottles were flushed with helium gas and sealed with rubber stoppers and aluminium crimps.

Sludge incubations were conducted in the presence and in the absence of sulphide to assess its inhibitory effect on the denitrifying process. Sulphide was provided from a stock solution to the final concentration of $20 \text{ mg S}^{2-} \text{ L}^{-1}$.

All experimental treatments were carried out in duplicate and incubated at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ in a shaker at 200 rpm. Every incubation bottle was an independent experimental unit, which was sacrificed after sampling. Liquid and headspace samples were taken periodically to determinate substrates utilization and products formation.

Microbial activity was evaluated in terms of consumption efficiency (E , %, mg of substrate consumed $[\text{mg of substrate fed}]^{-1}$) $\times 100$, yield (Y , mg of product $[\text{mg of substrate consumed}]^{-1}$), specific substrate consumption rate (q_s , g of substrate consumed $[\text{g VSS.d}]^{-1}$) and specific production rate (q_p , g of product $[\text{g VSS.d}]^{-1}$). Specific consumption and production rates were determined on the maximum

slope observed on linear regressions considering at least three sampling points. The coefficient of determination (R^2) was higher than 0.9 for most respiratory rates calculated, only a few determinations showed a R^2 around 0.8.

Analytical methods

Total organic carbon (TOC) and total inorganic carbon (TIC) were measuring in a TOC-meter (Shimadzu Co. Model TOC- 5000 A). Nitrate, nitrite and sulphate concentrations were determined using a HPLC (Waters) equipped with diode array detector by conductivity and with an anion column (IC-Pak A HC Waters 4.6×75 mm). The mobile phase was a borate-gluconate solution with the composition previously described²⁵ at 2 mL min^{-1} . *p*-cresol and its aromatic intermediates were monitored by HPLC (Pekin-Elmer serie 200 UV) using a C18 reverse phase column and a UV detector at 280 nm. The mobile phase was an acetonitrile:water (70:30) mixture at 1.5 mL min^{-1} . VSS were determined according to *Standard Methods*.²⁶ Acetate was measured by gas chromatography (GC) with flame ionization detection. The temperatures of the oven, injector and the detector were 120, 130 and $150 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. The gas composition in the headspace (CO_2 , N_2 and N_2O) was determined by GC (Varian 3350) with thermal conductivity detection. The temperatures of the column, injector and the detector were 50, 100 and $110 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively, with helium as the carrier gas at a constant flow rate of 16 mL min^{-1} . All samples were filtered through a $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ nylon membrane before analysis. Due to the rapid oxidation of sulphide, samples were immediately titrated using the iodometric method described in *Standard Methods* to determine the sulphide concentration.²⁶

RESULTS

The consortium evaluated performed high denitrifying rates (Table 2) and high extent of mineralization ($Y_{\text{HCO}_3^-} = 0.77 \pm 0.02$) of *p*-cresol, which was completely consumed during the first 12 hours of incubation in the absence of sulphide. The removal efficiency of nitrate (E_{NO_3}) was also 100% and the N_2 yield (Y_{N_2}) was 0.66 ± 0.01 after 48 hours of incubation. Addition of sulphide negatively affected the rate of most denitrifying steps (Table 2), but the $Y_{\text{HCO}_3^-}$ was only slightly affected (9% lower compared to the control lacking sulphide). Likewise, the Y_{N_2} decreased only 6% due to the addition of sulphide. However, it is worthy to mention that organotrophic denitrification was only significant after sulphide was totally consumed (Figure 1B). The rate of oxidation of TOC (q_{TOC}) diminished 37% (compared to the control lacking sulphide) while sulphide was present, but it was totally recovered after sulphide was depleted. The rate of mineralization ($q_{\text{HCO}_3^-}$) was also decreased by 29% compared to incubations performed without sulphide. The highest rate of TOC removal was associated to the reduction of nitrate to nitrite, but considerably decreased when nitrite was available as a unique terminal electron acceptor (Fig. 1-2). Despite all the negative effects observed in sulphide-supplemented incubations, the removal efficiencies were 100% for the three pollutants added (*p*-cresol, sulphide and nitrate) after 48 hours of incubation.

Table 2 Respiratory rates of the denitrifying sludge utilizing *p*-cresol as electron donor in the absence and in the presence of sulphide^a

Conditions	$q_{\text{NO}_3^-}$	$q_{\text{NO}_2^-}$	q_{N_2}	q_{TOC}	$q_{\text{HCO}_3^-}$
Nitrate + <i>p</i> -cresol	47.6 ± 6 (129 ± 5.6)	21 ± 1.0	50 ± 1.0	14.8 ± 2.0 (40.7 ± 0.5)	41 ± 2.0
Nitrate + <i>p</i> -cresol + sulphide	26 ± 6.0 (93 ± 2.0)	11 ± 1.0	28 ± 1.0	9.3 ± 1.0 (46.7 ± 0.8)	29 ± 2.0

^aData represent average from duplicate incubations and reported in $\text{mg N [g VSS.d]}^{-1}$ or $\text{mg C [g VSS.d]}^{-1}$. Data reported in parenthesis indicate respiratory rates observed after complete removal of sulphide from the cultures; for sludge incubations in the absence of sulphide means after 5 hours of incubation

Specific nitrate reduction rate ($q_{\text{NO}_3^-}$) decreased by 45% while sulphide was present in the culture (first 5 hours of incubation, Fig. 2). After sulphide was completely removed, the $q_{\text{NO}_3^-}$ was still 28% lower compared to the control incubated in the absence of sulphide. Nitrite reduction was the most affected step in denitrification by sulphide diminishing up to 48% its rate of reduction compared to the control lacking sulphide. Furthermore, the production rate of N_2 (q_{N_2}) diminished 36% due to the presence of sulphide in the denitrifying culture (Table 2). In contrast, no accumulation of N_2O was observed regardless the presence or absence of sulphide, suggesting that N_2O reduction was not the limiting step in the denitrifying process.

DISCUSSION

The objective of this study was to quantify the inhibitory effects of sulphide on an organotrophic denitrifying process using *p*-cresol as electron donor. The specific sulphide oxidation rate observed ($q_{\text{S}_2} = 82 \pm 8 \text{ mg S}^2/\text{g VSS}\cdot\text{d}$) was ~ 9 -fold higher than the q_{TOC} . Our results revealed the preference of the consortium evaluated to utilise sulphide over *p*-cresol, as energy source, even though the denitrifying sludge was previously stabilised under organotrophic conditions (Table 1). Preliminary reports agree with our results. For instance, Reyes-Avila *et al.* observed 14-fold higher q_{S_2} than q_{TOC} when sulphide and acetate were supplied as simultaneous energy sources, although the consortium was previously stabilised with both electron donors.² The lower q_{TOC} observed in the presence of sulphide was also negatively reflected on a minor degree of mineralization of *p*-cresol in the present study. Competition between lithotrophic and organotrophic microorganisms for the nitrate available could be dismissed as the inhibitory mechanism in the consortium evaluated since a stoichiometric amount of nitrate was supplied for simultaneous removal of both sulphide and *p*-cresol. This observation is also supported by the drastic increase observed in q_{TOC} after sulphide was totally depleted (Table 2, Fig. 1). Nitrate reduction rate diminished up to 45% while sulphide was present in the cultures and still remained 27% lower, compared to the control incubated without sulphide, even after sulphide was totally consumed. Reyes-Avila *et al.*² also observed a decrement of 42% on $q_{\text{NO}_3^-}$ by sulphide in a mixotrophic culture supplied with a stoichiometric nitrate concentration to achieve simultaneous oxidation of sulphide and acetate. Cardoso *et al.*¹¹ also found a decrease on the nitrate reduction rates by approximately 21-fold when sulphide concentration changed from 80 to 320 $\text{mg S}^2 \text{ L}^{-1}$. Other studies, in contrast, reported no effects on the nitrate reduction rates even at sulphide concentrations as high as 100 $\text{mg S}^2 \text{ L}^{-1}$ and 588 $\text{mg S}^2 \text{ L}^{-1}$, in batch assays⁷ and in continuous reactors², respectively.

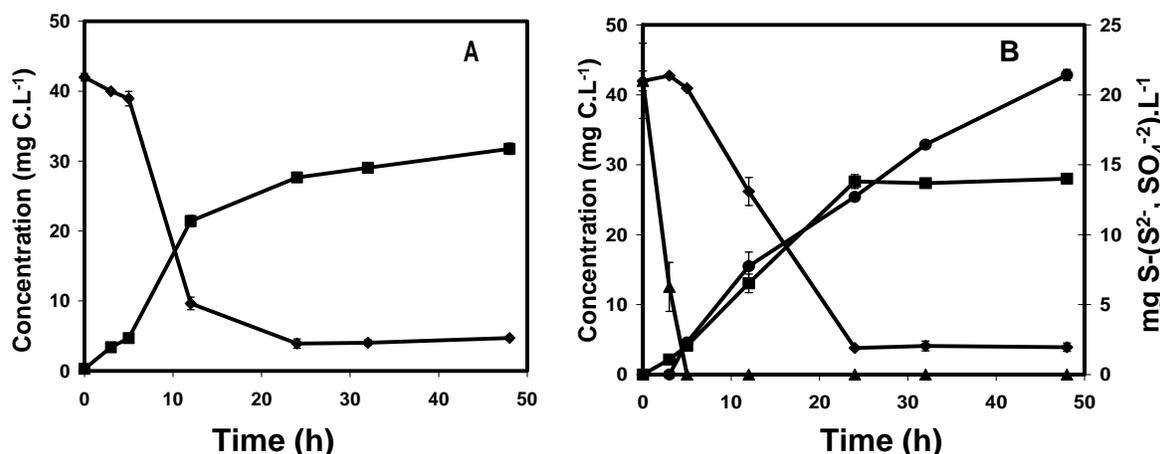


Fig. 1. Profiles of carbonaceous compounds during the mineralization of *p*-cresol by a denitrifying sludge (A) in the absence of sulphide and (B) in the presence of sulphide. Total Organic Carbon, TOC (\blacklozenge); Total Inorganic Carbon, TIC, (\blacksquare); Sulphide (\blacktriangle); Sulphate (\bullet). Data are results of duplicated experiments, error bars indicate standard deviation.

Nitrite reduction was the most affected step by sulphide in our assays ($q_{\text{NO}_2^-}$ 48% lower than the control lacking sulphide), which agree with several preliminary studies reporting accumulation of nitrite at different sulphide concentrations.^{2,8,11} However, Tugtas & Pavlostathis⁷ suggest that denitrifying consortia previously exposed to sulphide perform a lower accumulation of nitrite, due to DNRA, compared to non-acclimated consortia. Another issue at stake during the accumulation of nitrite, regardless the presence or absence of sulphide, observed in our experiments, is the concentration of nitrate available. Indeed, the highest $q_{\text{NO}_2^-}$ was obtained after nitrate was totally depleted in the cultures. The last scenario was also observed by Schönharting *et al.*²¹ in a denitrifying process with H_2S -containing medium. The authors attributed nitrite accumulation to kinetic aspects; namely, nitrate reduction proceeded faster than nitrite reduction, thus causing a high level of nitrite in the cultures. Thus, a synergistic effect of nitrate and sulphide may explain the accumulation of nitrite in the present study, which is corroborated by the accumulation of nitrite during the course of nitrate reduction in the absence of sulphide (Fig. 2).

It is plausible that precipitation of metals, such as iron and copper, which are essential components of denitrifying metalloenzymes,⁹ resulted from the addition of sulphide in the medium. The last observation was confirmed by a program of speciation (MINTEQA) utilised to identify precipitated compounds in our assays. Most iron species appeared precipitated even in the absence of sulphide, but there was a significant difference in copper species, which remain more soluble in the absence of sulphide. Manconi *et al.*⁵ observed an increase on nitrite concentration in a continuous reactor after precipitation of iron and copper salts occurred. Cervantes *et al.*¹⁸ also found accumulation of nitrite and N_2O caused by deficiencies in copper for denitrification. Thus, precipitation of trace metals, which are essential for denitrifying enzymes, may be one of the inhibitory mechanisms imposed by sulphide in our experiments. The last observation is also suggested by the fact that nitrite reduction rate remain lower in the sulphide-amended cultures, compared to the controls in the absence of sulphide, even after sulphide was totally depleted.

Our results differ from other studies, which reported release of gaseous denitrifying intermediates (*e.g.* N_2O and NO) due to inhibitory effects by sulphide. Certainly, Sørensen *et al.*¹⁷ suggested that sulphide was responsible of a partial inhibition of NO reduction and strong inhibition of N_2O reduction. Park *et al.*¹⁰ also observed accumulation of N_2O when the concentration of nitrate was increased in the presence of sulphide. These events did not occur in our experiments both in the absence and in the presence of sulphide.

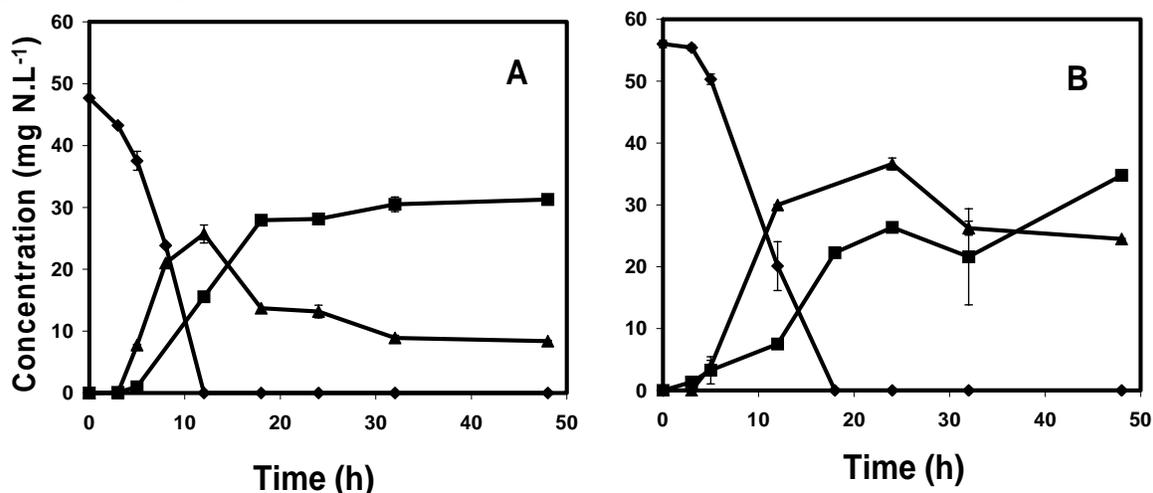


Fig. 2. Denitrifying activities obtained (A) in the absence of sulphide and (B) in the presence of sulphide with *p*-cresol as electron donor. NO_3^- -N (♦), NO_2^- -N (▲), N_2 (■). Data are results of duplicated experiments, error bars indicate standard deviation.

Complete oxidation of sulphide to sulphate was observed, even when incomplete denitrification was achieved (Fig. 1B). This respiratory pattern has previously been reported at stoichiometric C/N values^{3-5,11} and at higher C/N values^{8,11} either with S²⁻ or S₂O₃²⁻ as electron donors. Nevertheless, the production rate of sulphate was lower than the sulphide oxidation rate (19 mg S-SO₄²⁻ [g SSV.d]⁻¹ vs 82 mg S²⁻ [g SSV.d]⁻¹) in the present study. Analogous results were observed by Reyes-Avila *et al.*² who found that sulphide oxidation proceeded in two steps and the first step (oxidation of sulphide to intermediates) was faster than the second one (sulphate formation from thiosulphate and elemental sulphur). The bottleneck observed during the complete oxidation of sulphide to sulphate may also explain the accumulation of nitrite in our incubations. Elemental sulphur or polysulphide are the expected intermediates formed during the oxidation of sulphide to sulphate since thiosulphate was not detected.

It is important to emphasize that despite the inhibitory effects of sulphide observed in the denitrifying process, the consortium evaluated could achieved complete conversion of sulphide, nitrate and *p*-cresol, with a high degree of mineralization, during the incubation period (48 hours). Our results agree with preliminary studies revealing the successful application of UASB reactors for the simultaneous removal of sulphide, nitrate and *p*-cresol from wastewaters.⁴ UASB reactors are characterised by a high content of biomass (30–50 g VSS L⁻¹),²⁷ which allows high conversion rates of different pollutants. The large incubation period required for complete conversion of all contaminants in the present study suggests that HRT may be a key parameter to consider in UASB reactors in order to treat industrial effluents containing high levels of sulphide, nitrogen and phenolic compounds, such as those generated from petrochemical refineries.¹

CONCLUSIONS

Addition of sulphide to a denitrifying culture degrading *p*-cresol imposed inhibitory effects on the overall respiratory process. Sulphide was the preferred substrate oxidised, over *p*-cresol, via denitrification causing a 5-h lag phase on organotrophic denitrification. Nitrite reduction was the most affected step in the process probably due to a synergistic effect of NO₃⁻ and sulphide. Nitrate reduction rate and oxidation rate of *p*-cresol were also affected by the presence of sulphide. Our results suggest that simultaneous removal of sulphide and *p*-cresol could be achieved in denitrifying reactors, but a large HRT may be required to sustain an efficient process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by The Council of Science and Technology of Mexico (Grant SEP-CONACYT-C02-43144). Participation of E.R.M.E. was funded by CONACYT.

REFERENCES

1. Olmos A, Olguin P, Fajardo C, Razo-Flores E and Monroy O, Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour water from mexican oil refineries. *Energ Fuel* **18**:302-304 (2004).
2. Reyes-Avila J, Razo-Flores E and Gómez J, Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Res* **38**:3313-3321 (2004).
3. Vaiopoulou E, Melidis P and Aivasidis A, Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification. *Water Res* **39**:4101-4109 (2005).
4. Sierra-Alvarez R, Guerrero F, Rowlette P, Freeman S and Field JA, Comparison of chemo-, hetero- and mixotrophic denitrification in laboratory-scale UASBs. *Water Sci Technol* **52**(1-2):337-342 (2005).
5. Manconi L, Carucci A, Lens P and Rosseti S, Simultaneous biological removal of sulphide and nitrate by autotrophic denitrification in an activated sludge system. *Water Sci Technol* **53**(12): 91-99 (2006).

6. García de Lomas J, Corzo A, Gonzalez JM, Andrades JA, Iglesias E and Montero MJ, Nitrates Promotes Biological Oxidation of Sulfide in Wasterwaters: Experiment at Plant-Scale. *Biotechnol Bioeng* **93**:801-811 (2005).
7. Tugtas AE and Plavostathis SG, Effect of Sulfide on Nitrate Reduction in Mixed Methanogenic Cultures. *Biotechnol Bioeng* DOI 10.1002/bit.21338 (2007).
8. Trouve C, Chazal PM, Gueroux B and Sauvaitre N, Denitrification by news strains of *Thiobacillus denitrificans* under non-standard physicochemical conditions. Effect of temperature, pH, and sulphur source. *Environ Technol* **19**:601-610 (1998).
9. Mateju V, Cizinská S, Krejeí J and Janoch T, Biological water denitrification-A review. *Enzyme Microb Tech* **14**:170-183 (1992).
10. Park JH, Shin HS, Lee IS and Bae JH, Denitrification of high NO_3^- -N containing wastewater using elemental sulphur; nitrogen loading rate and N_2O production. *Environ Technol* **23**:53-65 (2002).
11. Cardoso BR, Sierra-Alvarez R, Rowlette P, Razo-Flores E, Gómez J and Field JA, Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnol Bioeng* **95**:1148-1157 (2006).
12. Cuervo-Lopez FM, Martínez F, Gutiérrez-Rojas M, Noyola RA and Gómez J, Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci Technol* **40**(8): 123-130 (1999).
13. Holub W, Przytocka-Jusiak M, Blaszczyk M and Mycielski R, Nitrite agent selecting anaerobic phenol-degrading microflora in petroleum refining sediments. *Water Res* **34**:1354-1358 (2000).
14. Akunna JC, Bizeau C and Moletta C, Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic and methanol. *Water Res* **7**:1303-1312 (1993).
15. Cervantes FJ, De la Rosa DA and Gómez J, Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresource Technol* **79**:165-170 (2001).
16. Peña-Calva A, Olmos-Dichara A, Viniegra-González G, Cuervo-López FM and Gómez J, Denitrification in presence of benzene, toluene and m-xylene. Kinetics, mass balance and yields. *Appl Biochem Biotech* **119**:195-208 (2004).
17. Sørensen J, Tiedje JM and Firestone R, Inhibition by Sulfide of Nitric and Nitrous Oxide Reduction by Denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microb* **39**:105-108 (1980).
18. Cervantes F, Monroy O and Gómez J, Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol Lett* **20**:959-961 (1998).
19. Jetten SM, Logemann S, Muyzer G, Robertson LA, de Vries S, van Loosdrecht CM and Kuenen G, Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenbock* **71**:75-93 (1997).
20. Speece RE, Anaerobic biotechnology for industrial wastewater. Archaea Press, Nashville, Tennessee (1996).
21. Schönharting B, Rehner R, Metzger J, Krauth K and Rizzi M, Release of nitrous oxide (N_2O) from denitrifying activated sludge caused by H_2S -containing wastewater: quantification and application of a new mathematical model. *Water Sci Technol* **38**(1):237-246 (1998).
22. Gommers PJ, Buleveld W, Zuiderwijk FJ and Kuenen JG, Simultaneous sulphide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Water Res* **22**:1075-1083 (1988).
23. Dalsgaard T and Bak F, Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: Sulfide inhibition, kinetics, and regulation. *Appl Environ Microb* **60**:291-297 (1994).
24. Kleerebezem R and Mendez R, Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. *Water Sci Technol* **45**(10):349-356 (2002).

25. Cervantes FJ, Enríquez JE, Galindo-Petátan E, Arvayo H, Razo-Flores E and Field JA, Biogenic sulphide plays a major role on the riboflavin-mediated decolourisation of azo dyes under sulphate reducing conditions. *Chemosphere* **68**:1082-1089 (2007).
26. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (20th edn). American Public Health Association. Washington DC (1998).
27. Lettinga G, van Velsen AFM, Hobma SW, de Zeeuw W and Klapwijk A, Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol Bioeng* **22**:699-734 (1980).